

**Einfluss der Biofilmbildung sowie pathogener und probiotischer
Bakterien auf die Virulenz von *Cronobacter sakazakii***

von Joyce Desiree Pandora Constance Stecklum

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

**Einfluss der Biofilmbildung sowie pathogener und probiotischer
Bakterien auf die Virulenz von *Cronobacter sakazakii***

von Joyce Desiree Pandora Constance Stecklum

aus Aachen

München 2018

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch

Arbeit angefertigt unter der Leitung von: Univ.-Prof. Dr. Dr. h.c. Erwin Märtlbauer

Mitbetreuung durch: Dr. Kristina Schauer

**Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Dr. h.c. Erwin Märtlbauer

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Ralf S. Müller

Tag der Promotion: 10. Februar 2018

Für meine Familie

&

für Roland

*Es ist nicht genug, zu wissen,
man muss es auch anwenden;
es ist nicht genug zu wollen,
man muss es auch tun.*

Johann Wolfgang von Goethe

INHALTSVERZEICHNIS

I. EINLEITUNG.....	1
II. LITERATURÜBERSICHT.....	3
1. <i>Cronobacter sakazakii</i>	3
1.1. Taxonomische Stellung	3
1.2. Vorkommen und Nachweismethoden.....	5
1.3. Klinik und Pathogenese	7
1.3.1. Pathogenitätsmechanismen und Virulenzfaktoren	8
1.3.1.1. Adhäsion und Invasion	10
1.3.1.2. Biofilmbildung.....	11
1.3.1.3. Stressbedingte Anpassungsmechanismen.....	15
1.3.2. Ko-Existenz von <i>C. sakazakii</i> mit probiotischen und pathogenen Keimen in Lebensmitteln	17
III. MATERIAL UND METHODEN.....	19
1. Material	19
1.1. Bakterienstämme	19
1.2. Zelllinien.....	21
1.3. PCR-Primer	21
1.4. Enzyme und Enzymreaktionspuffer	21
1.5. Chemikalien und Kits	22
1.6. Nährmedien.....	22
1.7. Antibiotika-Zusätze zu den Nährmedien	24
1.8. Medien und Lösungen für die Zellkultur.....	24
1.9. Puffer und Lösungen.....	25
1.9.1. Puffer und Lösungen zur DNA-Isolierung	25
1.9.2. Puffer und Lösungen für Agarosegelelektrophorese	25
1.9.3. Lösungen zur Resuspendierung von Zellen.....	26
1.10. Verbrauchsmaterialien	26
1.11. Geräte.....	27
1.12. Software	27
2. Methoden	28
2.1. Mikrobiologische Methoden.....	28

2.1.1.	Kultivierung von Bakterien	28
2.1.2.	Biofilmproduktion	28
2.1.2.1.	Biofilmbildung auf Festmedium.....	28
2.1.2.2.	Biofilmbildung in Flüssigmedium.....	28
2.1.2.3.	Auftrennung des Biofilms in Aggregatzellen und planktonische Zellen.....	29
2.1.2.4.	Nachweis von Zellulose im Biofilm auf Kongo-Rot-Agar (CRA) (nach Suppiger <i>et al.</i> , 2016).....	29
2.1.3.	Induktion und Reaktivierung des VBNC-Stadiums	29
2.1.3.1.	Induktion des VNBC-Stadiums	29
2.1.3.2.	Reaktivierung in Flüssigmedium.....	30
2.1.3.3.	Reaktivierung in modifizierten Standard-Nährmedien (nach Weber <i>et al.</i> , 2009).....	30
2.1.3.4.	Reaktivierung unter Zusatz von Katalase	30
2.1.3.5.	Reaktivierung unter <i>in vitro</i> Simulation neonataler Magen-Darm- Bedingungen (modifiziert nach Buriti <i>et al.</i> , 2010).....	30
2.2.	Molekulargenetische Methoden.....	31
2.2.1.	DNA-Isolierung	31
2.2.1.1.	Präparation von genomischer DNA.....	31
2.2.1.2.	Präparation von genomischer DNA (<i>quick version</i>).....	32
2.2.1.3.	Präparation von Plasmid-DNA	32
2.2.2.	Konzentrationsbestimmung von DNA	32
2.2.3.	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	32
2.2.3.1.	PCR mit ganzen Zellen als Template	33
2.2.4.	Techniken zur Charakterisierung von DNA-Molekülen	34
2.2.4.1.	Agarosegelelektrophorese.....	34
2.3.	Allgemeine biochemische Methoden	34
2.3.1.	Kristallviolett-Färbung (modifiziert nach Hartmann <i>et al.</i> , 2010)	34
2.3.2.	Isolierung von extrazellulären Polysacchariden	35
2.3.3.	Isolierung von zellgebundenen Exopolysacchariden (EPS)	36
2.3.4.	Anthrontest	37
2.4.	Zellkultur	38
2.4.1.	Kultivierung von eukaryotischen Zellen	38
2.4.2.	Einfrieren und Auftauen von eukaryotischen Zellen.....	39
2.4.2.1.	Einfrieren	39
2.4.2.2.	Auftauen	39

2.4.3.	Bestimmung der Lebendzellzahl	39
2.5.	Methoden zur Analyse des Pathogenitätsverhaltens von <i>C. sakazakii</i>	40
2.5.1.	Herstellung von Infektionsaliquots	40
2.5.1.1.	Herstellung des Infektionsaliquots von <i>C. sakazakii</i>	40
2.5.1.2.	Herstellung des Infektionsaliquots von <i>L. monocytogenes</i>	40
2.5.1.3.	Herstellung des Infektionsaliquots von <i>B. cereus</i>	40
2.5.1.4.	Herstellung des Infektionsaliquots von <i>Lactobacillus</i> spp.	40
2.5.2.	Standard-Gentamicinassay	41
2.5.3.	Gentamicin-Invasionsassay mit pathogener Begleitflora	42
2.5.4.	Gentamicin-Invasionsassay mit probiotischer Begleitflora	43
2.5.5.	Gentamicin-Invasionsassay mit VBNC-Zellen	43
2.5.6.	Zytotoxizitätstest	44
2.6.	Wachstumsanalysen	45
2.6.1.	Wachstumsanalyse von <i>C. sakazakii</i> -Stämmen	45
2.6.2.	Wachstumsanalyse von <i>C. sakazakii</i> ES 5 bei Ko-Inokulation mit <i>B. cereus</i> ..	45
2.6.3.	Wachstumsanalyse von <i>C. sakazakii</i> ES 5 bei Ko-Inokulation mit probiotischen <i>Lactobacillus</i> -Stämmen	46
2.6.4.	Messung der antimikrobiellen Aktivität von <i>Lactobacillus</i> spp. (nach Jacobsen <i>et al.</i> , 1999)	47
2.6.5.	Wachstumsanalyse von <i>C. sakazakii</i> ES 5 in Säuglingsnahrung mit Zusatz von <i>Lactobacillus</i> -Überständen	47
2.6.6.	Bestimmung der colony-forming units (CFU)	48
2.6.7.	Bestimmung der CFU in der Infektionslösung I	48
2.7.	Fluoreszenzmikroskopie	49
2.7.1.	Lebend-Tod-Färbung	49
2.7.2.	DAPI-Färbung	49
IV.	ERGEBNISSE	51
1.	Physiologische und biochemische Biofilmcharakterisierung bei <i>Cronobacter sakazakii</i>	51
1.1.	Wachstum und Biofilm-Phänotyp auf verschiedenen festen Nährmedien	51
1.2.	Wachstum und Biofilm-Phänotyp in Flüssigmedium	54
1.3.	Nachweis der Zellulose-Biosynthese auf Kongo-Rot-Agar	57
1.4.	Quantitative Bestimmung der Biofilmkomponenten	58
1.4.1.	Vegetative Zellen	59

1.4.2.	Gesamtbiofilmmatrix	59
1.4.3.	Protein- und eDNA-Gehalt	61
1.4.4.	Kohlenhydratbestimmung	62
2.	Induktion und Reaktivierung von VBNC-(<i>viable but nonculturable</i>)	
	Stadien bei <i>C. sakazakii</i>	64
2.1.	Induktion des VBNC-Stadiums durch Austrocknung	64
2.2.	Reaktivierung von VBNC-Zellen in modifizierten Standardmedien	67
2.3.	Reaktivierung von VBNC-Zellen in trinkfertiger Säuglingsanfangsmilch	68
2.4.	Reaktivierung von VBNC-Zellen in Caco-2-Kulturüberstand	69
2.5.	Reaktivierung von VBNC-Zellen in BPW mit Zusatz von Katalase	71
2.6.	Reaktivierung von VBNC-Zellen unter <i>in vitro</i> gastrointestinalen Bedingungen	72
3.	Phänotypische Analyse der <i>C. sakazakii</i>-Stämme im Zellkultursystem	73
3.1.	Untersuchung der Invasivität von <i>C. sakazakii</i> -Stämmen in Caco-2-Zelllinie	74
3.2.	Untersuchung der Invasivität von Aggregaten und planktonischen Zellen aus dem Biofilm von <i>C. sakazakii</i> -Stämmen in Caco-2-Zelllinie	75
3.3.	Untersuchung der Kolonisation von Caco-2-Zellen durch <i>C. sakazakii</i> im VBNC-Stadium	76
4.	Untersuchung der Kolonisation von <i>C. sakazakii</i> ES 5 in Gegenwart von pathogenen und probiotischen Bakterien.....	79
4.1.	Zytotoxizitätsanalyse von <i>B. cereus</i> F837/76 auf Caco-2-Zellen.....	79
4.2.	Wachstumskinetik von <i>C. sakazakii</i> ES 5 und <i>B. cereus</i> F837/76 in einer Ko-Kultur.....	81
4.3.	Untersuchung der Kolonisationsfähigkeit von <i>C. sakazakii</i> ES 5 ^{Amp} nach Vorbehandlung der Darmepithelzellen Caco-2 und HT-29 mit <i>B. cereus</i> - Kultur.....	82
4.4.	Untersuchung der Kolonisation von <i>C. sakazakii</i> ES 5 in die Darmepithelzellen Caco-2 und HT-29 in Ko-Infektion mit <i>L.</i> <i>monocytogenes</i>	85
4.5.	Untersuchung der Kolonisation von <i>C. sakazakii</i> ES 5 in mit <i>B. cereus</i> F837/76 vorinkubierten Darmepithelzellen Caco-2 und HT-29 in Ko- Infektion mit <i>L. monocytogenes</i>	87
4.6.	Untersuchung der antimikrobiellen Wirkung von Probiotika auf das Wachstum von <i>C. sakazakii</i> ES 5	89

4.7.	Einfluss von Probiotika auf die Kolonisation von <i>C. sakazakii</i> ES 5 in Caco-2- und HT-29-Zellen.....	93
4.8.	Untersuchung der antimikrobiellen Wirkung von <i>Lactobacillus</i> -Stämmen auf die Kolonisationsfähigkeit von <i>C. sakazakii</i> ES 5.....	96
4.9.	Wachstum von <i>C. sakazakii</i> ES 5 in Säuglingsnahrung auf Milchpulverbasis (PIF) unter Zugabe steriler Überstände von probiotischen <i>Lactobacillus</i> -Stämmen	100
V. DISKUSSION		103
1.	Bedeutung der Biofilmbildung für die Pathogenität von <i>C. sakazakii</i>.....	103
1.1.	Biofilm – interaktive Lebensweise von Bakterien in der Umwelt	103
1.2.	Die Bedeutung des Biofilms für die Virulenz von <i>C. sakazakii</i>	114
1.3.	VBNC-Zustand – raffinierte Überlebensstrategie der Bakterien.....	116
2.	Einfluss pathogener und probiotischer Bakterien auf die Virulenz von <i>C. sakazakii</i>	121
2.1.	Der Einfluss von pathogenen Bakterien in Lebensmitteln für die Virulenz von <i>C. sakazakii</i>	122
2.2.	Die Rolle von probiotischen Milchsäurebakterien während der Wirtskolonisation von <i>C. sakazakii</i>	129
3.	Ausblick	135
VI. ZUSAMMENFASSUNG.....		137
VII.SUMMARY.....		139
VIII.LITERATURVERZEICHNIS.....		141
IX. ANHANG		163
X. DANKSAGUNG		173

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1: Schematische Darstellung der Biofilmbildung auf abiotischen/ biotischen Oberflächen (=sessile Form).	12
Abb. 2: Glucose-Eichkurve	38
Abb. 3: Biofilmmorphologie von <i>C. sakazakii</i> -Stämmen auf MM-Agar, Milch-Agar und LB-Agar nach 24 h bei 37 °C und bei Raumtemperatur.	52
Abb. 4: Prozentuale Darstellung der biofilmproduzierenden <i>C. sakazakii</i> -Stämme bei Umweltisolaten und klinischen Isolaten auf verschiedenen Medien.	54
Abb. 5: Wachstum von <i>C. sakazakii</i> -Stämmen ES 5, 21122, 21029 und ihrer <i>wzx</i> -Mutanten bei 37 °C in LB (Mittelwerte stammen aus zwei Replikaten pro Stamm).	55
Abb. 6: Biofilmbildung von <i>C. sakazakii</i> -Stämmen in MM nach 48 h bei Raumtemperatur.	56
Abb. 7: Koloniemorphologie von <i>C. sakazakii</i> -Stämmen auf Kongo-Rot-Agar nach 3 d Inkubation bei Raumtemperatur.	57
Abb. 8: Nachweis der Zellulose-Biosynthesegene aus dem <i>bcs</i> ABC-Operon.	58
Abb. 9: Bakterientiter in der Biofilmmatrix auf Milch-Agar nach 48 h bei Raumtemperatur.	59
Abb. 10: Nachweis der Biofilmbildung bei <i>C. sakazakii</i> -Stämmen mittels Kristallviolett-Färbung.	60
Abb. 11: Biofilmbildung bei den Umwelt- und klinischen Isolaten von <i>C. sakazakii</i> -Stämmen.	60
Abb. 12: Gruppierung der <i>C. sakazakii</i> -Stämme nach ihrer Herkunft und an Oberflächen produzierter Biofilmmenge.	61
Abb. 13: Biofilmbildung bei ausgewählten <i>C. sakazakii</i> -Stämmen mit und ohne Proteinase K-Behandlung.	62
Abb. 14: Vergleich der EPS-Produktion bei ausgewählten <i>C. sakazakii</i> -Stämmen: (A) EPS-Gesamtmenge und (B) Differenzierung zwischen extrazellulären und zellgebundenen EPS.	64
Abb. 15: Induktionsverlauf des VBNC-Stadiums durch Austrocknung bei <i>C. sakazakii</i> -Stämmen: (A) Aggregatzellen und (B) planktonische Zellen.	65
Abb. 16: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der ein Jahr alten VBNC-Zellen von <i>C. sakazakii</i> 21122 (A) Aggregatzelle und (B) planktonischer Zelle.	66
Abb. 17: Reaktivierung von <i>C. sakazakii</i> -Stämmen in trinkfertiger	

Säuglingsanfangsmilch: (A) Aggregatzellen und (B) planktonische Zellen.	69
Abb. 18: Reaktivierung von <i>C. sakazakii</i> -Stämmen in Caco-2-Kulturüberstand: (A)	
Aggregatzellen und (B) planktonische Zellen.	71
Abb. 19: Schematische Darstellung des neonatalen Verdauungsprozesses (modifiziert	
nach Buriti <i>et al.</i> , 2010).	72
Abb. 20: Exemplarische Darstellung der Reaktivierung der VBNC-Zellen von	
<i>C. sakazakii</i> -Stämmen unter <i>in vitro</i> gastrointestinalen Bedingungen.	73
Abb. 21: Prozentuale Darstellung des Invasionsverhaltens ausgewählter <i>C. sakazakii</i> -	
Stämme in (A) undifferenzierten und in (B) ausdifferenzierten Caco-2-Zellen. .	75
Abb. 22: Invasionsverhalten von Aggregatzellen und planktonischen Zellen von	
<i>C. sakazakii</i> -Stämmen in nicht differenzierte und ausdifferenzierte	
(polarisierte) Caco-2-Zellen.	76
Abb. 23: Reaktivierung der VBNC-Zellen ausgewählter <i>C. sakazakii</i> -Stämme im Caco-	
2-Kulturüberstand (A) und Kolonisationsverhalten in polarisierten Caco-2-	
Zellen (B).	78
Abb. 24: Zytotoxizität der Übernachtkultur von <i>B. cereus</i> F837/76 in verschiedenen	
Medien.	80
Abb. 25: Phasenkontrastaufnahme der Caco-2-Zellen nach Inkubation mit <i>B. cereus</i> -	
ÜNK für (A) 5 min, (B) 10 min, (C) 15 min im Vergleich zu (D)	
unbehandelten Caco-2-Zellen.	81
Abb. 26: Wachstum von <i>C. sakazakii</i> ES 5 ^{Amp} und <i>B. cereus</i> F837/76 während einer	
Ko-Kultivierung in RPMI-Medium im Vergleich zur Mono-Kultivierung der	
beiden Stämme.	82
Abb. 27: Prozentuale Darstellung des Kolonisationsverhaltens von <i>C. sakazakii</i> ES 5 ^{Amp}	
in (A) polarisierte Caco-2- und (B) HT-29-Zellen mit und ohne (<i>C. sakazakii</i>	
ES 5 ^{Amp} -Kontrolle) Inkubation mit <i>B. cereus</i> F837/76.	85
Abb. 28: Prozentuale Darstellung des Kolonisationsverhaltens von <i>C. sakazakii</i> ES 5 in	
Caco-2-Zellen (A) und HT-29-Zellen (B) in Ko-Infektion mit <i>L.</i>	
<i>monocytogenes</i> EGD- <i>gfp</i> im Vergleich zum Standard-Gentamicinassay.	87
Abb. 29: Prozentuale Darstellung des Invasionsverhaltens von <i>C. sakazakii</i> ES 5 ^{Amp} und	
<i>L. monocytogenes</i> EGD- <i>gfp</i> in (A) Caco-2- und (B) HT-29-Zellen. Die Zellen	
wurden vor der Ko-Infektion mit <i>B. cereus</i> F837/76 für 5 Minuten	
vorinkubiert.	89
Abb. 30: Antibakterielle Aktivität von <i>L. casei</i> , <i>L. rhamnosus</i> und <i>L. helveticus</i> auf	

<i>C. sakazakii</i> ES 5. Die Probiotika wurden mit einer OD ₆₀₀ von 6,5 auf MRS-Agar gespotet, für 24 h bei 37 °C anaerob bebrütet und mit einer <i>C. sakazakii</i> ES 5-Tagkultur bzw. Übernachtskultur überschichtet.	91
Abb. 31: Wachstumshemmung von <i>C. sakazakii</i> ES 5 durch Ko-Kultivierung mit <i>Lactobacillus</i> -Stämmen auf MRS-Medium im Vergleich zum Kontrollansatz mit Ampicillin.	92
Abb. 32: Wachstum von <i>C. sakazakii</i> ES 5 in Ko-Kultivierung mit <i>Lactobacillus</i> -Stämmen. Die schwarze Linie stellt das Wachstum von <i>C. sakazakii</i> ES 5 ohne probiotische <i>Lactobacillus</i> -Stämme dar. Die Mittelwerte stammen aus drei unabhängigen Replikaten.	93
Abb. 33: Prozentuale Darstellung der Adhäsion und Invasion von <i>C. sakazakii</i> ES 5 in Caco-2- und HT-29-Zellen nach Vorinkubation mit <i>L. casei</i> , <i>L. rhamnosus</i> und <i>L. helveticus</i> . Die Werte sind ins prozentuale Verhältnis zum Kontrollansatz ohne Vorbehandlung mit Probiotika (=100 %, schwarze durchgezogene Linie) gesetzt.	95
Abb. 34: Prozentuale Darstellung der Adhäsion und Invasion von <i>C. sakazakii</i> ES 5 in HT-29-Zellen.	96
Abb. 35: Prozentuale Darstellung des Adhäsions- und Invasionsverhaltens von <i>C. sakazakii</i> ES 5 in ausdifferenzierten Caco-2-Zellen. Die Zellen wurden mit antimikrobiell wirkenden Überständen von <i>L. casei</i> , <i>L. rhamnosus</i> und <i>L. helveticus</i> vorbehandelt.	98
Abb. 36: Prozentuale Darstellung des Adhäsions- und Invasionsverhaltens von <i>C. sakazakii</i> ES 5 in HT-29-Zellen. Die Zellen wurden mit antimikrobiell wirkenden Überständen von <i>L. casei</i> , <i>L. rhamnosus</i> und <i>L. helveticus</i> vorbehandelt.	100
Abb. 37: Wachstum von <i>C. sakazakii</i> ES 5 in PIF mit Zusatz von probiotischem Überstand von (A) <i>L. casei</i> , (B) <i>L. rhamnosus</i> und (C) <i>L. helveticus</i> nach 20 h Inkubation bei 37 °C.	102
Abb. 38: Schematische Darstellung der Einflussfaktoren, Bestandteile und Funktionen des Biofilms bei <i>Cronobacter</i> spp.	104
Abb. 39: Übersicht der Medien und ihr Effekt auf die Reaktivierung von <i>C. sakazakii</i> VBNC-Zellen.	119

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: In dieser Arbeit verwendete Bakterien-Stämme.	19
Tabelle 2: In dieser Arbeit verwendete Zelllinien.	21
Tabelle 3: In dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotid-Primer.	21
Tabelle 4: In dieser Arbeit verwendete Enzyme und Enzymreaktionspuffer.	21
Tabelle 5: In dieser Arbeit verwendete Chemikalien.	22
Tabelle 6: In dieser Arbeit verwendete Antibiotika.	24
Tabelle 7: In dieser Arbeit verwendete Geräte.	27
Tabelle 8: Reaktivierung der VBNC-Zellen in verschiedenen Medien mit Zusatz von 8-Hydroxyquinolin und Ammoniumeisen(III)-citrat.	67
Tabelle 9: Induktionsverlauf des VBNC-Stadiums von <i>C. sakazakii</i> -Stämmen durch Austrocknung.	163
Tabelle 10: Reaktivierung von <i>C. sakazakii</i> -Stämmen in Säuglingsanfangsmilch.	164
Tabelle 11: Reaktivierung von <i>C. sakazakii</i> -Stämmen in Caco-2-Kulturüberstand.	165
Tabelle 12: Reaktivierung von <i>C. sakazakii</i> -Stämmen unter <i>in vitro</i> gastrointestinalen Bedingungen.	166
Tabelle 13: Invasionsverhalten von <i>C. sakazakii</i> -Stämmen in Caco-2-Zellen.	166
Tabelle 14: Invasionsverhalten von Aggregaten und planktonischen Zellen von <i>C. sakazakii</i> -Stämmen in Caco-2-Zellen.	167
Tabelle 15: Reaktivierung in Caco-2-Kulturüberstand und Invasion der VBNC-Zellen von <i>C. sakazakii</i> -Stämmen in Caco-2-Zellen.	167
Tabelle 16: Ko-Infektion von <i>C. sakazakii</i> ES 5 mit <i>B. cereus</i> bzw. <i>L. monocytogenes</i> in ausdifferenzierte Caco-2-Zellen.	168
Tabelle 17: Ko-Infektion von <i>C. sakazakii</i> ES 5 mit <i>B. cereus</i> bzw. <i>L. monocytogenes</i> in HT-29-Zellen.	168
Tabelle 18: Ko-Infektion von <i>C. sakazakii</i> ES 5 mit <i>B. cereus</i> und <i>L. monocytogenes</i> in Caco-2- bzw. HT-29-Zellen.	168
Tabelle 19: Kolonisationsverhalten von <i>C. sakazakii</i> ES 5 nach Vorbehandlung der eukaryotischen Zellen mit Probiotika.	169
Tabelle 20: Kolonisationsverhalten von <i>C. sakazakii</i> ES 5 bei Ko-Infektion mit Probiotika.	169
Tabelle 21: Kolonisationsverhalten von <i>C. sakazakii</i> ES 5 nach Vorbehandlung der eukaryotischen Zellen mit dem Überstand probiotischer Mikroorganismen.	170
Tabelle 22: Wachstumsverhalten von <i>C. sakazakii</i> ES 5 und <i>B. cereus</i> bei Ko-	

Kultivierung in RPMI-Medium.....	170
Tabelle 23: Wachstumsverhalten von <i>C. sakazakii</i> ES 5 und probiotischen	
<i>Lactobacillus</i> -Stämmen bei Ko-Kultivierung in RPMI-Medium.	171
Tabelle 24: Wachstum von <i>C. sakazakii</i> ES 5 in PIF mit Zusatz von sterilem Überstand	
von <i>Lactobacillus</i> -Stämmen.....	171

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
A. dest.	destilliertes Wasser
Amp	Ampicillin
<i>B. ce</i>	<i>Bacillus cereus</i>
<i>B. cereus</i>	<i>Bacillus cereus</i>
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
bp	Basenpaar
BPW	<i>Buffered Pepton Water</i> , gepuffertes Peptonwasser
bzw.	beziehungsweise
CA	<i>colanic acid</i> (Kolansäure)
Ca	Calcium
CCI	<i>Chromogenic Cronobacter Isolation</i>
CFU	<i>Colony Forming Unit</i> , koloniebildende Einheit
CGY	Caseinhydrolysat-Bouillon
CRA	<i>Congo-Red-Agar</i> , Kongorot-Agar
<i>C. sa</i>	<i>Cronobacter sakazakii</i>
<i>C. sakazakii</i>	<i>Cronobacter sakazakii</i>
CytK	<i>Cytotoxin K</i> , Zytotoxin K
d.h.	das heißt
DC	<i>Dendritic Cells</i>
DC-SIGN	<i>Dendritic Cell-Specific ICAM-Grabbing Non-Integrin</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
eDNA	extrazelluläre DNA
EPS	Exopolysaccharid
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (und andere)
FCS	Fetales Kälberserum
g	Gramm
GIT	Magen-Darm-Trakt (Gastrointestinaltrakt)
h	Stunde
Hbl	Hämolysin BL

Kan	Kanamycin
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
<i>L.</i>	<i>Lactobacillus</i>
l	Liter
LAB	<i>Lactic acid bacteria</i> (Milchsäurebakterien)
LB	Luria-Bertani
<i>L. m.</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
<i>L. monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
LPS	Lipopolysaccharid
M	Molar (Mol/l)
mA	Milliampere
MALDI-TOF	Matrix-assistierte Laser-Desorption-Ionisierung mit Flugzeitanalysator
mg	Milligramm
Mg	Magnesium
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
MM	Minimalmedium
MOI	<i>Multiplicity of infection</i>
MRS	<i>De Man, Rogosa, Sharpe</i>
NEC	Nekrotisierende Enterokolitits
Nhe	Nicht-hämolytisches Enterotoxin
nm	Nanometer
OD ₆₀₀	optische Dichte gemessen bei einer Wellenlänge von 600 nm
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PI	Propidiumiodid
<i>p.i.</i>	<i>post infection</i> (nach der Infektion)
PIF	<i>Powdered Infant Formula</i> (pulverförmige Säuglingsnahrung)
RNA	Ribonucleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
s.	Sekunde

s.o.	siehe oben
Tab.	Tabelle
U	Unit
ü/N	über Nacht
ÜNK	Übernachtkultur
V	Volt
UV	ultraviolett
VBNC	<i>viable but nonculturable</i> (vital aber nicht kultivierbar)
z.B.	zum Beispiel
WST	<i>water-soluble tetrazolium salt</i> , wasserlösliches Tetrazoliumsalz
ZNS	zentrales Nervensystem

I. EINLEITUNG

Cronobacter sakazakii ist ein Gram-negatives, stäbchenförmiges, fakultativ anaerobes Bakterium aus der Familie der *Enterobacteriaceae*, welches ubiquitär ist und bereits aus verschiedenen Quellen isoliert werden konnte. Insbesondere bei Neugeborenen verursacht *C. sakazakii* schwerwiegende Erkrankungen wie nekrotisierende Enterocolitis (NEC), Septikämie und Meningitis. Aus epidemiologischer Sicht ist pulverförmige Säuglingsnahrung (*powdered infant formula*; PIF) die häufigste Infektionsquelle. Die Kontamination von PIF kann sowohl während des Herstellungsprozesses als auch bei der Rekonstitution des zunächst unbedenklichen Produktes infolge schlechter Hygiene- und Aufbewahrungsmaßnahmen erfolgen.

Die Fähigkeit von *C. sakazakii* Biofilm zu produzieren, erhöht das Risiko einer Kontamination, da die Bakterienzellen, umgeben von einer extrazellulären polysaccharidhaltigen Matrix, vor äußeren Umwelteinflüssen wie Austrocknung, pH-Extremen und antimikrobiellen Substanzen geschützt sind. Für die Lebensmittelindustrie ist diese Eigenschaft ein großes Problem, da Biofilm die Resistenz der Bakterien gegen Reinigungs- und Desinfektionsmaßnahmen erhöht und somit als Quelle mikrobieller Kontamination eine Gefahr für die Lebensmittelsicherheit darstellt.

Für *Cronobacter* spp. besteht bereits eine Korrelation zwischen Biofilmbildung und der Persistenz außerhalb des Wirts, jedoch gibt es bisher noch keine Verbindung zu seiner Virulenz. Ein Ziel dieser Arbeit war, die Biofilmbildung unterschiedlicher *C. sakazakii*-Stämme unter verschiedenen Bedingungen zu charakterisieren und die Virulenz der Bakterien aus der Biofilmmatrix im Vergleich zu den planktonischen Zellen im Zellkulturmodell zu untersuchen. Dadurch sollte geklärt werden, ob die Fähigkeit zur Biofilmbildung einen Virulenzfaktor darstellt oder andere Pathogenitätsfaktoren und somit die Kolonisation behindert.

Die Anpassungsfähigkeit an Stressbedingungen (z.B. Austrocknung) ermöglicht es *C. sakazakii*, seinen Stoffwechsel auf ein Minimum zu reduzieren und in den VBNC-Zustand (*viable but nonculturable*) überzugehen. In diesem Zustand kann *C. sakazakii* über einen langen Zeitraum in PIF persistieren und ist mittels Standard-Nachweisverfahren (ISO 22964:2017) nicht zu detektieren, sondern benötigt längere Anreicherungszeiten und andere Medien. Dadurch bleibt eine *Cronobacter*-Kontamination der Säuglingsnahrung häufig unerkant.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit bestand darin, Faktoren zu identifizieren, die eine Reaktivierung der VBNC-Zellen von *C. sakazakii* induzieren. Darüber hinaus wurde der Effekt dieser Stoffwechselanpassung auf die Virulenz untersucht, indem VBNC-Zellen unter standardisierten Bedingungen hergestellt, reaktiviert und ihre Invasivität in Caco-2-Zellen untersucht wurde.

Da eine sterile Herstellung von PIF nicht möglich ist, können neben *C. sakazakii* noch andere ubiquitäre Pathogene zu einer Kontamination des Produktes während der Herstellung oder bei der Rekonstitution des zunächst unbedenklichen Produkts führen. Als prophylaktische Maßnahme bieten daher einige Hersteller von Säuglingsnahrung ihre Produkte mit einem Zusatz von probiotischen Mikroorganismen an, welche bei Zufuhr in angemessener Menge das Wachstum der pathogenen Stämme hemmen und die Gesundheit des Kindes fördern sollen. Der Einfluss von pathogenen und probiotischen Bakterien auf die Virulenz von *C. sakazakii* wurde mittels einer Ko-Infektion in den humanen Darmepithelzellen Caco-2 und HT-29 untersucht. Dabei sollten einerseits Hinweise gesammelt werden, ob Gram-positive Pathogene wie *B. cereus* und *L. monocytogenes* die Invasion von *C. sakazakii* erleichtern, z.B. durch Porenbildung in der Wirtszellmembran bzw. während der Internalisierung in die eukaryotische Zelle. Andererseits sollte auch analysiert werden, ob Probiotika das Wachstum und die Invasivität von *C. sakazakii* vermindern und auf welche Weise die Wirtszelle vor dem Eindringen des Pathogens geschützt wird: Durch Bildung einer mechanischen Barriere an der Wirtszelloberfläche, durch Absenkung des pH-Werts oder durch Produktion antimikrobieller Substanzen. Zusätzlich sollten in der vorliegenden Arbeit mögliche Ansätze eines sicheren und wirksamen Einsatzes von Probiotika in der Säuglingsnahrung etabliert werden, indem der inhibitorische Effekt steriler Überstände von probiotischen Kulturen auf das Wachstum von *C. sakazakii* in PIF untersucht wurde.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. *Cronobacter sakazakii*

1.1. Taxonomische Stellung

Bei der Gattung *Cronobacter* spp. handelt es sich um Gram-negative, fakultativ anaerobe, peritrich begeißelte, motile, nicht sporenbildende Stäbchen, die ubiquitär sind und zu der Familie der *Enterobacteriaceae* gehören. Erstmals wurden sie von Urmenyi und Franklin 1961 im Zusammenhang mit einer tödlich verlaufenden Sepsis und Meningitis bei Neugeborenen als „gelb pigmentierte *Enterobacter cloacae*“ beschrieben. Im Jahr 1980 erfolgte dann die Klassifizierung als eigene Spezies mit dem Namen *Enterobacter sakazakii*, da Unterschiede hinsichtlich der biochemischen Eigenschaften, der DNA-Sequenz (*16S rDNA gene sequence analysis*), der Antibiotika-Resistenz und der Pigmentierung zwischen *E. cloacae* und *E. sakazakii* nachgewiesen werden konnten (Farmer *et al.*, 1980). Da Farmer *et al.* (1980) innerhalb der neuen Spezies 15 Biogruppen differenzieren konnten, kamen sie zu der Annahme, dass es sich eventuell um unterschiedliche Spezies handeln könnte. Basierend auf umfangreichen molekularbiologischen Analysen wurden im Jahr 2007 durch Iversen *et al.* sechs verschiedene Spezies nachgewiesen, sodass *E. sakazakii* als Genus *Cronobacter* spp. taxonomisch reklassifiziert wurde. Die Spezies *C. sakazakii*, *C. malonaticus*, *C. turicensis*, *C. muytjensii*, *C. dublinensis* und *C. genomospecies* 1 wurden 2012 durch Joseph *et al.* um eine weitere Spezies, nämlich *C. condimenti*, ergänzt und *C. genomospecies* 1 in *C. universalis* umbenannt (Joseph *et al.*, 2012). Anhand von MLST (*multilocus sequence typing*) Daten wurden 2013 die nicht pathogenen Spezies *E. helveticus*, *E. pulveris* und *E. zurichensis* zunächst ebenfalls dem Genus *Cronobacter* zugeordnet (*C. helveticus*, *C. pulveris* und *C. zurichensis*) (Brady *et al.*, 2013), jedoch konnte Stephan *et al.* wenige Zeit später durch detaillierte Genomanalysen und biochemische Charakterisierung zeigen, dass keine Übereinstimmung dieser Spezies mit dem Genus *Enterobacter* oder *Cronobacter* vorlagen und diese als *Franconibacter pulveris* com. nov., *Franconibacter helveticus* comb. nov. und *Siccibacter turicensis* com. nov. taxonomisch neu einzuordnen sind (Stephan *et al.*, 2014). Somit stellt sich die Taxonomie des Genus *Cronobacter* wie folgt dar:

Familie: *Enterobacteriaceae*

Gattung: *Cronobacter*

Spezies: *C. sakazakii*

C. malonaticus

C. muytjensii

C. turicensis

C. dublinensis

C. condimenti

C. universalis

Anhand der Zusammensetzung des Lipopolysaccharids (LPS) erfolgt innerhalb einer Spezies die Einteilung in verschiedene Serotypen bei Gram-negativen Bakterien. Die antigenwirkende Struktur besteht aus drei Hauptkomponenten: Lipid A, Kernoligosaccharid (*Core*) und O-spezifische Seitenkette. Das hoch konservierte Lipid A ist in der äußeren Zellmembran verankert und über glykosidische Bindung mit dem *Core* verbunden. Die daran anschließende hoch variable O-spezifische Seitenkette wirkt als antigene Struktur (O-Antigen) zur Charakterisierung des Serotyps. Die Unterschiede dieser Struktur basieren auf der chemischen Zusammensetzung und Anordnung der aus vier bis fünf verschiedenen Zuckereinheiten bestehenden „*repeating units*“ (Wang *et al.*, 2010).

Bei *C. sakazakii* wurden anhand des Genlocus *rfb* zuerst die beiden Serotypen O1 und O2 definiert. Die Entwicklung serotypspezifischer Oligonukleotide (Primer) für die Gene *wehC* (O1) und *wehI* (O2), welche für die Glycosyltransferase kodieren, ermöglichte erstmals den molekularbiologischen Nachweis der *C. sakazakii*-Serotypen O1 und O2 mittels PCR (Mullane *et al.*, 2008). Anhand der Agglutination von Kaninchenserum etablierten Sun *et al.* (2011) ein Serotypisierungsschema für die bereits definierten Serotypen O1 und O2 sowie für fünf neue Serotypen (O3-O7) und stellten fest, dass es sich bei 69,7 % der insgesamt 119 serotypisierten *C. sakazakii*-Stämme um die von Mullane *et al.* (2008) definierten Serotypen O1 und O2 handelte (Sun *et al.*, 2011). Kurze Zeit später gelang der PCR-Nachweis des Serotyps O3 nach erfolgreicher Konstruktion *wzx*-spezifischer Primer (Jarvis *et al.*, 2011). Die Sequenzierung des LPS-Biosynthese-Clusters der Serotypen O4-O7 ermöglichte schließlich die Entwicklung *wzy*- (O1-O6) und *wzx*- (O7) spezifischer Primer und die Durchführung einer multiplex PCR, mit der alle *C. sakazakii*-Serotypen O1-O7 gleichzeitig bestimmt werden konnten (Sun *et al.*, 2012).

Die Tatsache, dass spezifische Primer für die *C. sakazakii*-Serotypen O5 und O6 auch andere *Cronobacter* spp.-Stämme erkannten, ließen erste Zweifel über die Einteilung der

Serotypen von Sun *et al.* (2012) aufkommen. Das Ergebnis der Serotypisierung von insgesamt 409 *Cronobacter* spp.-Stämmen, bei dem die von Sun *et al.* (2012) entwickelten Primer für Serotyp O3 mit keinem der *C. sakazakii*-Stämme, jedoch mit allen getesteten *C. turicensis*-Stämmen vom Serotyp O3 reagierten, erhärtete den Verdacht, dass das Serotypisierungsschema von Sun *et al.* (2012) fehlerhaft sei (Yan *et al.*, 2015). Darüber hinaus stellten Yan *et al.* (2015) fest, dass die *C. sakazakii*-Serotyp O6 spezifischen Primer von Sun *et al.* (2012) mit 28 von 30 *C. sakazakii*-Stämmen reagierten, die mit dem Serotypisierungsschema von Mullane *et al.* (2008) als *C. malonaticus* Serotyp O2 identifiziert wurden. Mittels umfangreicher Analysen (Genomsequenzierung, MLST, LPS-Ladderstruktur, O-AG-Struktur) gelang der Nachweis, dass es sich bei den beiden *C. sakazakii*-Stämmen, die von Sun *et al.* zur Entwicklung der Serotyp O5- und O6-spezifischen Primer verwendet wurden, um die Spezies *C. malonaticus* handelte (Blazkova *et al.*, 2015). Schließlich erfolgte die Reklassifizierung der ursprünglich als Serotyp O6 eingeteilten *C. sakazakii*-Stämme in *C. malonaticus* Serotyp O2. Darüber hinaus wurden die *C. sakazakii*-Stämme, welche nach Sun *et al.* (2012) als Serotyp O5 charakterisiert wurden, zu einem neuen Serotyp, nämlich *C. malonaticus* Serotyp O3 zugeordnet. Außerdem wurde vorgeschlagen, den Stamm G3882, der laut PubMLST-Datenbank der Spezies *C. malonaticus* zuzuordnen ist, jedoch als *C. turicensis* Serotyp O2 identifiziert wurde, als Referenzstamm für *C. malonaticus* Serotyp O4 zu verwenden. Somit stellt sich das Serotypisierungsschema für *Cronobacter* spp. wie folgt dar:

<i>C. sakazakii</i>	O1-O4, O7
<i>C. turicensis</i>	O1-O3
<i>C. malonaticus</i>	O1-O4
<i>C. muytjensii</i>	O1-O2
<i>C. condimenti</i>	O1
<i>C. dublinensis</i>	O1-O2
<i>C. universalis</i>	O1-O2

1.2. Vorkommen und Nachweismethoden

Cronobacter spp. sind ubiquitäre Bakterien, die aus einer Vielzahl von Lebensmitteln tierischen (z.B. Milchprodukte, Fleisch) und pflanzlichen (z.B. Gemüse, Reis) Ursprungs isoliert werden konnten (Iversen *et al.*, 2004a, Healy *et al.*, 2010). Aufgrund seiner hohen Tenazität gegenüber Austrocknung, konnte *Cronobacter* spp. auch in getrockneten Produkten wie Kräutern, Gewürzen und Müsli nachgewiesen werden (Baumgartner *et al.*,

2009). Als Kontaminationsquelle von Lebensmitteln sind insbesondere Pflanzen und Insekten in Betracht zu ziehen, da sie ein natürliches Reservoir für *Cronobacter* spp. darstellen (Kuzina *et al.*, 2001, Jaradat *et al.*, 2009). Angesichts seines ubiquitären Charakters kommt dem Bakterium insbesondere bei der Herstellung von pulverförmiger Säuglingsnahrung (*powdered infant formula*, PIF) eine große Bedeutung zu, da PIF als epidemiologisch wichtigste Kontaminationsquelle schwerwiegende Erkrankungen bei Säuglingen hervorrufen kann (Biering *et al.*, 1989, Bowen *et al.*, 2006, Simmons *et al.*, 1989, Muytjens *et al.*, 1990). Die Kontamination der Säuglingsnahrung kann infolge intrinsischer Faktoren, vor allem durch kontaminierte Grundzutaten unmittelbar während des Herstellungsprozesses oder extrinsischer Faktoren, wie z.B. kontaminierte Gerätschaften oder schlechte Hygiene- und Aufbewahrungsmaßnahmen bei der Rekonstitution des Pulvers, auftreten (Simmons *et al.*, 1989, FAO/WHO, 2004). Schätzungen zufolge sank die Prävalenz von *Cronobacter* spp. in PIF von 14 % im Jahr 1988 (Muytjens *et al.*, 1988) und 6,7 % im Jahr 1997 (Nazarowec-White *et al.*, 1997a) auf 2,5 % im Jahr 2001 (Heuvelink *et al.*, 2002) und ist seitdem mit ca. 2-2,5 % konstant (Iversen and Forsythe, 2004a, Iversen *et al.*, 2008, Mullane *et al.*, 2007).

Aufgrund seiner hohen Tenazität gegenüber osmotischem Stress, Hitze und Trockenheit sowie seiner Fähigkeit, Biofilm zu bilden, ist *Cronobacter* spp. in der Lage, über einen langen Zeitraum in PIF und in der Umwelt zu persistieren (Nazarowec-White *et al.*, 1997b, Breeuwer *et al.*, 2003, Iversen *et al.*, 2004b). Das Ergebnis einer Langzeitstudie über 2,5 Jahre ergab, dass *C. sakazakii* deutlich länger in PIF überleben kann als andere enteropathogene Keime, wie beispielsweise *E. coli* und Salmonellen, die bereits nach 15 Monaten nicht mehr nachzuweisen waren (Barron *et al.*, 2007). Ein Zusammenhang zwischen der Kapselbildung und der Überlebensfähigkeit konnte insoweit festgestellt werden, dass ausschließlich Kapsel produzierende *C. sakazakii*-Stämme nach 2,5 Jahren in PIF nachgewiesen werden konnten.

Die Fähigkeit, Biofilm auf Oberflächen von Latex, Polycarbonat und Silikon bilden zu können, erhöht zudem das Risiko einer nosokomialen Infektion, z.B. bei der Intensivversorgung von Säuglingen mittels einer Magensonde (Farmer *et al.*, 1980, Iversen *et al.*, 2004b). Des Weiteren weisen einige Studien darauf hin, dass *Cronobacter* spp. zwar thermotoleranter sind als andere *Enterobacteriaceae* (Nazarowec-White and Farber, 1997b, Breeuwer *et al.*, 2003, Chap *et al.*, 2009), jedoch wird das Risiko einer Infektion bei Zubereitung der Säuglingsnahrung mit über 70°C heißem Wasser und einer Lagerung bei unter 5°C deutlich gesenkt (FAO/WHO, 2007, Silano *et al.*, 2016). Auf Grundlage

dieser Erkenntnis, wurde von der FAO/WHO im Jahr 2007 eine Empfehlung für die Zubereitung und Lagerung von PIF veröffentlicht.

Der Nachweis von *Cronobacter* spp. in Säuglingsnahrung erfolgt standardmäßig mittels eines vertikalen kulturellen Verfahrens (ISO/TS 22964:2017), bei dem die Probe zunächst nicht-selektiv in gepuffertem Peptonwasser angereichert und anschließend in mLST-Vancomycin-Bouillon zur Selektivanreicherung überführt wird. Der Ausstrich auf Selektivnährböden wie z.B. ESIA (*Enterobacter sakazakii* Isolation Agar) oder CCI (*Chromogenic Cronobacter Isolation Agar*) ergibt bei positivem Befund charakteristische blau-grüne Kolonien, die bei der Spaltung von BCl- α -D-glucopyranosid durch die bakterielle α -Glucosidase entstehen. Abschließend erfolgt eine biochemische Bestätigung (API-Test-Kit) und PCR-basierende Methoden tragen zur weiteren Charakterisierung der Isolate bei.

1.3. Klinik und Pathogenese

Cronobacter spp. gelten als opportunistisch pathogen und verursachen insbesondere bei Säuglingen und immunkompromittierten Personen schwerwiegende Erkrankungen. Betroffen sind vor allem Frühchen, Neugeborene mit einem geringen Geburtsgewicht von unter 2,5 kg und unter vier Wochen alte Säuglinge (Himelright *et al.*, 2002, Bar-Oz *et al.*, 2001, Gurtler *et al.*, 2005). Klinisch manifestiert sich eine *Cronobacter* spp. Infektion in Form einer nekrotisierenden Enterocolitis (NEC), Bakteriämie und Meningitis, die mit einer Mortalität von 40 % bis 80 % einhergeht (Bowen and Braden, 2006, Friedemann, 2009). Patienten, die sich von einer ZNS-Infektion erholen, entwickeln meist irreversible Spätschäden, die sich in geistigen und motorischen Defiziten äußern (Drudy *et al.*, 2006, Friedemann, 2009). Nach der oralen Aufnahme kommt es primär zu einer lokalen Infektion des Darms (NEC), die durch eine inflammatorische Reaktion in Form einer massiven Zytokin-Ausschüttung verursacht wird. Die resultierende Schädigung des apikalen Epitheliums begünstigt die Passage der Blut-Darm-Schranke und führt zur systemischen Ausbreitung des Bakteriums im Blutkreislauf. Über das Gefäßsystem des Wirts gelangt das Pathogen schließlich zum Gehirn, wo es die Blut-Hirn-Schranke überwindet und zur Infektion des ZNS führt (Bowen and Braden, 2006).

Die Infektion von Erwachsenen erfolgt überwiegend nosokomial in Folge einer immunsupprimierenden Vorerkrankung und äußert sich klinisch in Form einer Sepsis, Konjunktivitis, Pneumonie, Osteomyelitis oder einer Katheter assoziierten Wundinfektionen (Gosney *et al.*, 2006, Gosney, 2008, Lai, 2001). Dennoch ist die Inzidenz

von Infektionen mit invasivem Verlauf (Sepsis, Meningitis) bei Neugeborenen häufiger als bei Erwachsenen (Patrick *et al.*, 2014).

1.3.1. Pathogenitätsmechanismen und Virulenzfaktoren

Damit es zu einer systemischen Infektion und zur Symptomausprägung kommt, muss *Cronobacter* zunächst in die Epithelzellen des Darms eindringen und die Blut-Darm-Schranke überwinden. Zahlreiche Studien konnten bisher die Kolonisation gastrointestinaler und endothelialer Gewebe belegen (Kim *et al.*, 2008, Mange *et al.*, 2006), jedoch konnten die Mechanismen der Infektion noch nicht vollständig charakterisiert werden. Ergebnisse umfangreicher *in vitro*-Studien im Zellkultursystem ergaben, dass *Cronobacter*-Isolate unterschiedliche Virulenztypen aufweisen (Caubilla-Barron *et al.*, 2007, Townsend *et al.*, 2008). Die Einteilung erfolgte auf Grundlage des Ergebnisses von Townsend *et al.* (2008), dass sich die mittels umfangreicher Analysen (16s RNA Sequenzierung, Pulsfeld-Gelelektrophorese) von Caubilla-Barron *et al.* (2007) in vier verschiedene Pulsotypen eingeteilten Stämme eines *C. sakazakii*-Ausbruchs in Frankreich, in ihrer Virulenz im *in vitro*-Modell unterscheiden. Innerhalb der sieben Spezies konnten jedoch nur *C. sakazakii*, *C. malonaticus* und *C. turicensis* mit einer neonatalen Infektion in Verbindung gebracht werden (Healy *et al.*, 2010, Kucerova *et al.*, 2010).

Dem Pathogen stehen zahlreiche Virulenzfaktoren zur Verfügung. Eine große Rolle bei der Schädigung von Membranen spielt das Immunogen Lipopolysaccharid (LPS), welches beim Absterben des Bakteriums unter Stressbedingungen freigesetzt wird und eine Lockerung der Zellkontakte (*tight junctions*) hervorruft (Townsend *et al.*, 2007). Das Endotoxin, welches bei allen Gram-negativen Bakterien in der äußeren Zellmembran lokalisiert ist, besteht aus drei Komponenten: Lipid A, Kernoligosaccharid und O-spezifische Polysaccharidkette. Die hochkonservierte Lipid A-Region ist in der äußeren Zellmembran verankert und besteht aus Glucosamin-Disaccharid, welches über Esterbindungen mit langkettigen Fettsäuren verbunden ist. Über eine glykosidische Bindung ist das Lipid A mit der Kernregion (*Core*), einem Oligosaccharid aus Keto-desoxy-octonat (KDO), Heptosen, Glucose, Galactose und N-Acetylglucosamin, verbunden. An die *Core*-Region schließt die O-spezifische Seitenkette, welche sich aus wiederholenden Oligosaccharideinheiten (*repeating units*) zusammensetzt, an. Diese bestehen hauptsächlich aus Hexosen, deren Abfolge, Art der glykosidischen Bindung und chemische Zusammensetzung nicht nur auf Gattungsebene, sondern auch Speziesebene

stark variiert. Sie wirkt als antigene Struktur und wird daher auch zur Charakterisierung des Serotyps verwendet.

Neben den Endotoxinen wurde von Pagotto *et al.* (2003) auch die Synthese von Enterotoxinen bei *C. sakazakii* beschrieben. Mittels des *suckling mouse models* konnte er bei vier von 18 Isolaten einen toxischen Effekt nach intraperitonealer Gabe von Kulturfiltraten nachweisen. Allerdings ließ sich der zytotoxische Effekt nicht bei allen vier Isolaten *in vitro* reproduzieren (Pagotto *et al.*, 2003). Raghav und Aggarwal gelang der Nachweis eines 66 kDa großen Proteins, dessen zytotoxische Wirkung auch nach 30-minütigem Kochen bei 90°C noch im Tiermodell nachweisbar war (Raghav *et al.*, 2007). Dennoch konnte weder der Wirkmechanismus noch das für Enterotoxin kodierende Gen identifiziert werden. Aufgrund dieser unzureichenden Datenlage bleibt die Produktion von Enterotoxinen bei *Cronobacter* spp. umstritten.

Um die Blut-Darm-Schranke zu penetrieren und eine systemische Infektion hervorzurufen, schädigt das Bakterium das Darmepithel, indem es die *tight junctions*, die Zellkontakte benachbarter Epithelzellen, zerstört. Begünstigt wird dieser Prozess bei Neugeborenen zudem durch die nicht vollständig ausgebildeten *tight junctions*, die noch unvollständig entwickelte angeborene Immunantwort sowie die unzureichende Ansäuerung des Magens und die unabgeschlossene Kolonisation der kompetitiven Mikroflora im Gastrointestinaltrakt (Townsend *et al.*, 2007, Holy *et al.*, 2013).

Als weiterer Virulenzfaktor fungiert das *outer membrane protein A* (OmpA), welches durch das Gen *ompA* kodiert wird (Nair *et al.*, 2006). OmpA ist in mehreren Schritten der Pathogenese von *Cronobacter* involviert, wie z.B. Adhäsion, Invasion und Überleben im Blutkreislauf (Smith *et al.*, 2007). Emami *et al.* postulierten, dass die Wechselwirkung zwischen *ompA* exprimierenden *C. sakazakii*-Stämmen und dendritischen Zellen (DC) zum Zusammenbruch der Blut-Darm-Barriere durch Sekretion pro- und inflammatorischer Zytokine führt und somit entscheidend zur Entstehung der NEC beitragen (Emami *et al.*, 2011). Die dendritischen Zellen initiieren als Teil des angeborenen Immunsystems die primäre spezifische Immunantwort, indem sie nach Kontakt mit dem wirtsfremden Protein reifen und das Antigen naiven T-Zellen präsentieren. *C. sakazakii* unterbindet diesen Reifungsprozess, indem er an DC-SIGN (*Dendritic Cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin*) bindet und dadurch eine Antigenpräsentation und die Ausschüttung der Zytokine IL-1 und TGF- α verhindert (Mittal *et al.*, 2009a). Bedingt durch die Blockade werden die immunsupprimierenden Zytokine IL-10 und TGF- β

sezerniert, welche die *tight junctions* zerstören und zur Apoptose der Enterozyten führen (Emami *et al.*, 2011). Die Bedeutung des OmpA für das Überleben von *C. sakazakii* in DC konnten Mittal *et al.* (2009) nachweisen, indem sie die Überlebensfähigkeit von *ompA*-Mutanten mit der von *ompA*-exprimierenden *Cronobacter*-Stämmen verglichen und feststellten, dass beide zwar in DC aufgenommen werden, jedoch nur Stämme mit intaktem OmpA in DC persistieren und replizieren können (Mittal *et al.*, 2009b). Darüber hinaus konnten Emami *et al.* in ihren Studien zeigen, dass die Wechselwirkung zwischen OmpA-positiven *C. sakazakii*-Stämmen und DC auch zu einer Erhöhung des inflammatorischen Mediators Stickstoffmonoxid (NO) führt, der den zytopathischen Effekt auf die Darmepithelzellen verstärkt (Emami *et al.*, 2011). Während Emami *et al.* die Rolle der dendritischen Zellen bei der Entstehung der NEC untersuchten, analysierten Hunter *et al.* die NO-Produktion intestinaler Epithelzellen (IEC-6) von Ratten nach einer Infektion mit *C. sakazakii*. Sie stellten fest, dass die Infektion mit *C. sakazakii* zu einer erhöhten NO-Produktion führt und folglich die Apoptose der Zellen verursacht (Hunter *et al.*, 2008).

Die Fähigkeit, im Blutkreislauf zu überleben und dabei die Immunantwort des Wirtes zu umgehen, stellt einen weiteren kritischen Faktor bei der Pathogenese von *Cronobacter* dar. Studien von Franco *et al.* identifizierten die Protease Cpa (plasminogen activator), die zirkulierende Serumproteine spaltet und Komplementfaktoren abbaut, sodass keine Immunantwort initiiert werden kann (Franco *et al.*, 2011). Weitere Faktoren, die zu der Serumresistenz beitragen, sind Membranproteine Wzy-C, eine O-Antigen Ligase und Iga (Intracellular growth attenuator), sowie die protektiven Hilfsproteine (Chaperone) (Schwizer *et al.*, 2013). Darüber hinaus konnte Schwizer *et al.* die immunogene Wirkung von Fimbrien demonstrieren, da das Fehlen dieser Strukturen die Überlebensrate von *Cronobacter* im Serum erhöhte.

1.3.1.1. Adhäsion und Invasion

Die Fähigkeit, den Gastrointestinaltrakt zu kolonisieren, spielt eine wichtige Rolle bei der Pathogenese lebensmittelassoziierter Pathogene. Trotz umfangreicher Studien zur Adhäsions- und Invasionsfähigkeit von *C. sakazakii* im Zellkultursystem mit intestinalen Darmepithelzellen (Caco-2), mikrovaskulären Hirnendothelzellen (HBMEC) und Makrophagen (Raw 264.7) sind die an der Adhäsion und Invasion beteiligten Wechselwirkungen zwischen der Wirtszelloberfläche und bakteriellen Membranproteinen von *C. sakazakii* noch weitgehend unbekannt.

Das Glykoprotein Fibronektin, welches Teil der extrazellulären Matrix eukaryotischer

Zellen ist, spielt eine zentrale Rolle bei der Adhäsion verschiedener pathogener Keime (Pankov *et al.*, 2002, Feeney *et al.*, 2011). Studien zufolge dient Fibronectin an der Wirtsoberfläche als Rezeptor für das Porin OmpA, welches eine essentielle Rolle bei der Invasion spielt (Nair *et al.*, 2007, Kim *et al.*, 2010, Mange *et al.*, 2006, Smith *et al.*, 2007). Eine Studie mit *ompA*-Deletionsmutanten konnte demonstrieren, dass der Verlust des *ompA*-Gens eine signifikante Reduzierung der Invasivität um 80 % in intestinalen Darmepithelzellen (Caco-2) und um 83 % in mikrovaskulären Hirnendothelzellen (HBMEC) bewirkt (Kim *et al.*, 2010, Nair *et al.*, 2009). In dieser Studie konnte zudem gezeigt werden, dass nicht nur die Expression von *ompA*, sondern auch von *ompX* erfolgen muss, damit eine Adhäsion und Invasion stattfindet, da $\Delta ompA/\Delta ompX$ -Mutanten eine signifikant verminderte Invasivität in die epithelialen Darmzelllinien Caco-2- und INT-407-Zellen aufweisen (Kim *et al.*, 2010). Die Bedeutung von OmpA bei der Infektion des Zentralen Nervensystems (ZNS) untersuchten Singamsetty *et al.* und stellten fest, dass die Expression von *ompA* an der Translokation vom Blut in mikrovaskuläre Hirnendothelzellen (HBMEC) bei *Cronobacter* beteiligt ist, indem es die Kondensation von Mikrotubuli sowie die Aktivierung der PI3-Kinase und PKC- α bewirkt (Singamsetty *et al.*, 2008).

Hartmann *et al.* untersuchte unter anderem den Einfluss von Flagellen auf die Adhäsionsfähigkeit an Caco-2-Zellen anhand verschiedener *C. sakazakii* ES 5 Transposoninsertionsmutanten und fanden heraus, dass *C. sakazakii*-Mutanten mit defekter oder gar fehlender Flagellenstruktur, eine verminderte Adhäsionsfähigkeit aufweisen (Hartmann *et al.*, 2010).

Ein intaktes Zytoskelett spielt als wichtiger Schutzmechanismus vor dem Eindringen von pathogenen Keimen eine große Rolle. Untersuchungen von Kim und Lössner zur Rolle des Zytoskeletts während der Invasion ergaben, dass die Schädigung der *tight junctions* und mikrotubularen Strukturen die Invasion in Caco-2-Zellen deutlich erhöht. Außerdem stellten sie fest, dass die Invasion ein aktiver Prozess ist, der eine Proteinsynthese voraussetzt und abhängig von der Infektionszeit und der Bakterienzahl ist (Kim and Loessner, 2008).

1.3.1.2. Biofilmbildung

Cronobacter spp. sind in der Lage, ihre Tenazität in der Umwelt durch die Bildung von Biofilm zu erhöhen. Dabei handelt es sich um einen Zusammenschluss von Bakterienzellen, welche, umgeben von einer selbstproduzierten hydratisierten polymeren Matrix, an abiotischen und biotischen Oberflächen gebunden sind (Lehner *et al.*, 2005).

Die Biofilmbildung ist ein komplexer, zeitabhängiger Prozess, der von zahlreichen Faktoren, wie dem Vorhandensein von Nährstoffen, der Temperatur und der Oberflächenstruktur, abhängig ist (Kim *et al.*, 2006, Meireles *et al.*, 2015) und darüber hinaus von Stamm zu Stamm in Ausprägung und Zusammensetzung variiert (Hartmann *et al.*, 2010). Die in Abb. 1 dargestellte Biofilmbildung auf festen Oberflächen beginnt mit der Anheftung planktonischer Zellen an die Oberfläche. Nach der irreversiblen Anheftung kommt es zunächst durch Teilung der sessilen Bakterienzellen zur Bildung einer Mikrokolonie und zur Produktion einer Polysaccharid haltigen extrazellulären Matrix. Während des Reifungsprozesses erfolgt die weitere Aufteilung der Zellen in Subpopulationen, durch die ihre Aufgaben innerhalb der Biofilmmatrix definiert werden (in der Abb. 1 durch schwarze und graue Zellen dargestellt). Im Zuge des weiteren Reifungsprozesses kommt es durch Abspaltung einiger Aggregate zur Rekolonisation des Biofilms sowie zum kontinuierlichen Austritt planktonischer Zellen in die Umgebung.

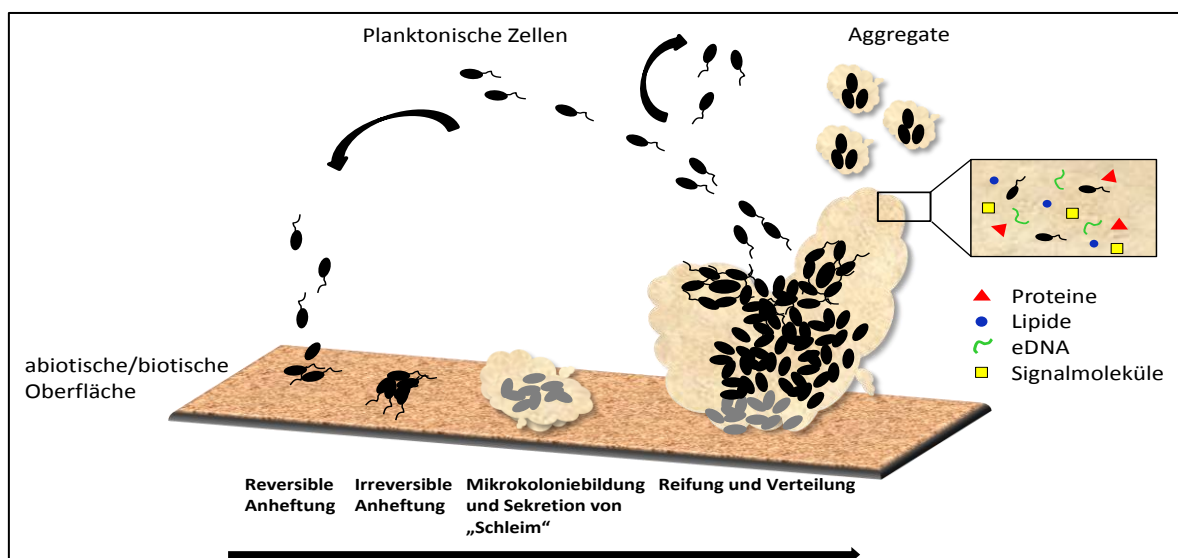


Abb. 1: Schematische Darstellung der Biofilmbildung auf abiotischen/ biotischen Oberflächen (=sessile Form).

Neben dem Oberflächen-assoziierten Biofilm kann *Cronobacter* spp. in Abhängigkeit von Umwelteinflüssen auch in Flüssigkeiten Aggregate ausbilden.

Die extrazelluläre, Polysaccharid-haltige Matrix besteht aus einem Konsortium an Substanzen: Sezernierte Exopolysaccharide (EPS), Proteine, Lipide, extrazelluläre DNA (eDNA) und niedermolekulare Signalmoleküle. Als physikalische Barriere schützt die Biofilmmatrix die Zellen vor schädlichen Umwelteinflüssen wie UV-Strahlung, osmotischem Stress, Hitze, Nährstoffmangel, Desinfektionsmitteln und anderen antimikrobiellen Substanzen sowie der Immunantwort (Costerton *et al.*, 1995, O'Toole *et al.*, 2000). Neben seiner Persistenz fördernden Bedeutung für das Pathogen spielt die

Biofilmbildung in der Lebensmittelindustrie als Quelle mikrobieller Kontamination (Lehner *et al.*, 2005, Hartmann *et al.*, 2010) sowie in der intensivmedizinischen Versorgung von Säuglingen mittels Magensonden eine große Rolle. Aufgrund seiner adhärenenten Eigenschaften auf Silikon, Latex, Glas und PVC Oberflächen (Iversen *et al.*, 2004b, Kim *et al.*, 2006, Lehner *et al.*, 2005) kann *C. sakazakii* Biofilme auf Medizinprodukten (z.B. Magensonden) ausbilden, welche zur künstlichen Ernährung von Frühchen verwendet werden. Die Körpertemperatur des Säuglings und die regelmäßige Verabreichung von Nährstoffen bieten dabei optimale Voraussetzungen für das Wachstum von *C. sakazakii* und die Reifung des Biofilms (Hurrell *et al.*, 2009). Reife Aggregate, die sich von der Oberfläche der Magensonde ablösen und in den Gastrointestinaltrakt gelangen, sind durch ihre umgebende Biofilmmatrix vor der Magensäure geschützt und begünstigen so die Infektion (Kim *et al.*, 2006).

Die Faktoren, die in die Biofilmbildung involviert sind, umfassen Flagellen zur Adhäsion an Oberflächen, die Synthese zellgebundener und extrazellulärer Exopolysaccharide sowie Zellulose als wesentliche Bestandteile der polymeren Matrix, und die interzelluläre Kommunikation in Form von *quorum sensing*.

Anhand von Insertionsmutanten konnte Hartmann *et al.* (2010) bereits zeigen, dass sowohl die Flagellenstruktur als auch die Zellulose-Synthese eine wichtige Rolle bei der Biofilmbildung spielen, denn Mutationen der jeweiligen Gene führten zu einer quantitativen und phänotypischen Veränderung der Biofilmbildung auf Festmedium. Die Fähigkeit, Zellulose zu synthetisieren, spielt bei der Adhäsion zwar keine Rolle, jedoch führt der Verlust der Flagellen zu einer signifikanten Reduktion des Adhäsionspotentials an Caco-2-Zellen (Hartmann *et al.*, 2010).

Zellulose ist, als wichtiger Bestandteil der Biofilmmatrix, unter anderem für die mechanische Stabilität des komplexen Biofilmgerüsts verantwortlich und schützt das Bakterium vor chemischen Umwelteinflüssen (Solano *et al.*, 2002, Zogaj *et al.*, 2003, Matthyse *et al.*, 1981). Gene für die Zellulose-Biosynthese werden durch das *bcsABZC*-Operon kodiert (Ross *et al.*, 1991), wobei *bcsA* für eine katalytische Zellulose-Synthase-Einheit, *bcsB* für das zyklische-di-GMP Bindeprotein und *bcsC* für Zellulose-Oxidoreduktase kodieren (Zogaj *et al.*, 2003, Grimm *et al.*, 2008). Die Transkription dieser Gene unterliegt dem Regulator AdrA (Zogaj *et al.*, 2001). Eine Studie von Hu *et al.* (2015) konnte anhand von *bcsA*- und *bcsB*-Mutanten die Bedeutung dieser Gene bei der Biofilmbildung demonstrieren, da bereits die Mutation in einem der beiden Gene zu einem

Verlust der Zellulosesynthesefähigkeit und somit auch der Biofilmbildung führte (Hu *et al.*, 2015). Darüber hinaus kann die Zellulosebildung phänotypisch auf Kongorot-Nähragar oder mittels Calcofluor-Färbung nachgewiesen werden. Die Kultivierung auf Kongorot-Nähragar führt je nach Produktion von Zellulose und Curli zu verschiedenen Koloniemorphologien, die sich hinsichtlich ihrer Farbe, Glanz und Oberflächenstruktur unterscheiden (Zogaj *et al.*, 2001, Zogaj *et al.*, 2003). Der fluoreszierende Farbstoff Calcofluor bindet dagegen nur an Zellulose haltigen Strukturen, welche unter UV-Licht detektiert werden können.

Ein weiterer wichtiger Bestandteil von Biofilmen sind Exopolysaccharide (EPS), die entweder von Bakterienzellen sezerniert werden oder in Form einer Kapsel an der Zelloberfläche gebunden sind. Sie bilden das Grundgerüst der Biofilmmatrix und schützen vor Stressfaktoren wie Hitze, Austrocknung oder der Immunantwort des Wirts. Durch die visköse Umhüllung der Mikroorganismen mit Exopolymeren sind Antigen wirkende Oberflächenstrukturen durch das Immunsystem des Wirtsorganismus nur schwer zu erkennen. Dennoch stellte Walsh *et al.* (2011) eine negative Korrelation zwischen der Hitzetoleranz und der EPS-Produktion fest. EPS produzierende Isolate waren demnach weniger hitzestabil als jene, die keine Fähigkeit zur EPS-Bildung aufwiesen (Walsh *et al.*, 2011). Zusätzlich untersuchten sie die Thermotoleranz einer Mutante, deren *wcaD*-Gen, das für die Synthese von Colanic acid (CA), eines Hauptbestandteils von EPS, kodiert, deletiert wurde. Im Vergleich zu ihrem kapselbildenden Wildtyp war die Mutante deutlich thermotoleranter, sodass sie zu der Annahme kamen, dass die Fähigkeit zur EPS-Synthese die Thermotoleranz reduziert. Die Produktion und Zusammensetzung der EPS ist stammspezifisch und wird von äußeren Umwelteinflüssen bestimmt. Fast alle *C. sakazakii*-Stämme sind in der Lage, eine Kapsel zu bilden, die als Schutz vor Austrocknung und als Barriere gegen die Wirkung von Antibiotika die Persistenz des Pathogens erhöht (Iversen *et al.*, 2004b, Scheepe-Leberkühne *et al.*, 1986, Ogrodzki *et al.*, 2015). Die Bedeutung der Kapsel für die Persistenz von *Cronobacter* spp. unter H₂O-Mangel, konnte durch die Detektion von kapselbildenden *C. sakazakii*-Stämmen in PIF nach über zwei Jahren demonstriert werden (Caubilla-Barron *et al.*, 2007). CA ist eines der Exopolysaccharide, das in *Cronobacter*-Biofilmen identifiziert wurde (Scheepe-Leberkühne and Wagner, 1986) und durch die *wzABCKM*-Gene kodiert wird (Joseph *et al.*, 2012).

Die in die Biofilmbildung involvierten Prozesse werden durch *quorum sensing*, einem interzellulären Kommunikationsmechanismus gesteuert, der auf der Produktion, Freisetzung und Detektion niedermolekularer Signalmoleküle basiert (Suppiger *et al.*,

2016). Nach der Detektion extrazellulärer Signalmoleküle wird bei Erreichen eines von der Populationsdichte abhängigen Schwellenwertes, die Expression bestimmter Target-Gene induziert, wodurch es zur partiellen oder vollständigen Auflösung des Biofilms kommen kann (Whitehead *et al.*, 2001, Waters *et al.*, 2005, Suppiger *et al.*, 2016, Solano *et al.*, 2014).

1.3.1.3. Stressbedingte Anpassungsmechanismen

Die Fähigkeit von *Cronobacter* spp. sich an äußere Umwelteinflüsse anzupassen und diverse Stressfaktoren (z.B. Austrocknung, Antibiotika, Hitze) zu überleben, ermöglicht die Persistenz des Pathogens in der Umwelt und erhöht somit das Risiko, insbesondere bei Neugeborenen und immunsupprimierten Personen, an einer Infektion zu erkranken.

Im Vergleich zu anderen Vertretern der Familie *Enterobacteriaceae* wurde bei *Cronobacter* spp. eine erhöhte Tenazität gegenüber Hitze und osmotischem Stress beschrieben. Mehrere Studien zur Stresstoleranz von *Cronobacter* spp. konnten das Wachstum bei Temperaturen von bis zu 47 °C (Breeuwer *et al.*, 2003, Nazarowec-White and Farber, 1997a) sowie die Persistenz des Pathogens in PIF nach über 2,5 Jahren dokumentieren (Barron and Forsythe, 2007). Als Mechanismen, die zum Überleben von *Cronobacter* spp. in Produkten mit niedrigem a_w -Wert beitragen, werden die Akkumulation osmoprotektiver Substanzen (z.B. Trehalose), Kapsel- und Biofilmbildung sowie der Übergang in das VBNC (*viable but nonculturable*)-Stadium diskutiert (Breeuwer *et al.*, 2003, Feeney and Sleator, 2011, Riedel *et al.*, 2007, Scheepe-Leberkühne and Wagner, 1986, Fakruddin *et al.*, 2017).

Erstmals von Xu *et al.* im Jahr 1982 bei *Escherichia coli* und *Vibrio cholerae* beschrieben, handelt es sich bei dem VBNC-Zustand um eine stressbedingte Anpassungsreaktion, bei der intrazelluläre Stoffwechselprozesse auf ein Minimum reduziert werden (Xu *et al.*, 1982, Oliver, 2010). Da VBNC-Zellen auf Standard-Nährboden kein Wachstum zeigen oder deutlich längere Inkubationszeiten bzw. bestimmte Inducer benötigen, müssen andere Nachweismethoden angewendet werden, die auf dem Nachweis der Genexpression mittels RT-PCR oder der Zellwandintegrität mittels Lebend-Tod-Färbung basieren. Aufgrund der verringerten Genexpression und Metabolisierungsrate sind VBNC-Zellen resistenter gegen physikalische und chemische Einflüsse, wie z.B. Desinfektionsmittel und Antibiotika (Oliver, 2010). Zwar ist die Virulenz von VBNC-Zellen bei *C. sakazakii* noch weitestgehend unbekannt, jedoch konnten Untersuchungen zur Virulenz bei *Vibrio* spp. zeigen, dass VBNC-Zellen zwar nicht in der Lage waren, direkt eine Infektion

hervorzurufen, jedoch konnten sie durch kurze Reaktivierungsprozesse ihre Virulenz zurück erlangen und so schwerwiegende Erkrankungen wie Gastroenteritis und Sepsis hervorrufen (Oliver *et al.*, 1995, Li *et al.*, 2014, Colwell *et al.*, 1996).

Bisherige Studien zur Sensibilität von *Cronobacter* spp. gegenüber Antibiotika kamen zu keinem einheitlichen Ergebnis. Obwohl eine *Cronobacter*-Infektion mit Standard-Antibiotika noch als gut behandelbar gilt und zahlreiche Studien zu dem Ergebnis kamen, dass keine Antibiotika-Resistenz im Vergleich zu anderen Keimen vorliegt, stellten andere Studien eine Prävalenz für einige Antibiotika-Resistenzen fest (Jaradat *et al.*, 2014, Pan *et al.*, 2014, Fei *et al.*, 2017). Dennoch sind die Aussagen über diese Antibiotika-Resistenzen nicht einheitlich wie bei anderen Antibiotika-resistenten Keimen (z.B. *Acinetobacter*). Nachdem bei *Cronobacter* spp. ursprünglich keine Resistenzen gegenüber Antibiotika festgestellt wurden, berichten mehrere Studien von neuen Stämmen, bei denen eine Resistenzentwicklung gegenüber Tetrazyklinen (Miranda *et al.*, 2003), Neomycin und Trimethoprim (El-Sharoud *et al.*, 2009) nachgewiesen werden konnte. Darüber hinaus wurden bei Untersuchungen von 78 Haushaltsküchen in Tennessee (USA) verschiedene Umweltisolate isoliert, die gegenüber Penicillin (76,1 %), Tetrazyklin (66,6 %), Ciprofloxacin (57,1 %) und Nalidixinsäure (47,6 %) resistent waren (Kilonzo-Nthenge *et al.*, 2012).

Im Zuge von Forschungsarbeiten zu alternativen antimikrobiellen Substanzen gegen *C. sakazakii* wurde der antimikrobielle Effekt von Bakteriophagen untersucht. Bei Studien zu ihrer Wirksamkeit in mit *C. sakazakii* infizierten Wachsmottenlarven (*Galleria mellonella*) konnte die Mortalität signifikant von 100% auf 16,6 % nach Verabreichung von GAP161-Phagen reduziert werden (Abbasifar *et al.*, 2014).

Untersuchungen zur Säuretoleranz ergaben in Abhängigkeit von Stamm und angewendeter Säure ein Wachstum bei pH-Werten von bis zu 4,5 bzw. 4,1 (Alvarez-Ordóñez *et al.*, 2012, Zhu *et al.*, 2013). Es liegen jedoch auch Studien vor, welche die Persistenz einzelner Stämme bei einem pH-Wert von 3,5 nach bis zu 5 Stunden belegen (Edelson-Mammel *et al.*, 2006). Somit kann *C. sakazakii* bei Neugeborenen mit einem physiologischen pH-Wert von 2,9-5,3 bzw. zwischen 4,6-5,8 bei 7-15 Tage alten Säuglingen (Sondheimer *et al.*, 1985), im Magen überleben. Gene, die eine *acid stress response* (ATR) induzieren, verstärken die Säuretoleranz des Pathogens, indem sie die Expression von Chaperonen kodierenden Genen einleiten. Die Chaperone reparieren geschädigte Proteine und erhalten die Zellintegrität aufrecht (Alvarez-Ordóñez *et al.*, 2014). Die Induktion von

Anpassungsmechanismen in Kombination mit der unvollständigen kompetitiven Mikroflora und dem geschwächten Immunsystem des Neugeborenen begünstigen somit die Infektion mit *C. sakazakii*.

1.3.2. Ko-Existenz von *C. sakazakii* mit probiotischen und pathogenen Keimen in Lebensmitteln

Trotz hoher Hygienestandards und umfassenden mikrobiologischen Qualitätskontrollen ist eine sterile Herstellung von pulverförmiger Säuglingsnahrung (PIF) aufgrund ihrer komplexen Zusammensetzung mit zum Teil hitzesensitiven Komponenten (Vitaminen, Proteine) nicht möglich. Folglich wird das Risiko einer intrinsischen Kontamination des Endprodukts durch die mikrobiologische Qualität jeder einzelnen Komponente, die zur pasteurisierten Milch zugegeben wird, determiniert. Pathogene Keime, die den Herstellungsprozess überleben oder während der Rekonstitution in die Nahrung gelangen, haben in der nährstoffreichen Säuglingsnahrung optimale Wachstumsbedingungen und stellen nicht nur für Neugeborene ein potentiell gesundheitliches Risiko dar. Neben *Cronobacter* spp. und *Salmonella enteritidis* als bedeutendste Erreger schwerwiegender, lebensbedrohlicher Erkrankungen bei Neugeborenen, werden auch *Escherichia coli*, *Citrobacter* spp. und *Klebsiella pneumoniae* als Vertreter der Familie *Enterobacteriaceae* mit PIF-assoziierten Kontaminationen in Verbindung gebracht. Doch auch andere ubiquitäre Pathogene wie *Clostridium* spp., *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* und *Staphylococcus* spp. können in die Milch gelangen (Kent *et al.*, 2015).

Als Präventivmaßnahme bieten einige Hersteller von PIF ihre Säuglingsnahrung mit einem Zusatz von probiotischen Mikroorganismen an, welche als lebende Mikroorganismen die Gesundheit fördern sollen, falls sie in ausreichender Menge aufgenommen werden (FAO/WHO, 2006). Bei Vertretern der Familie *Lactobacillaceae*, darunter *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. rhamnosus*, *L. plantarum*, *L. lactis* und *L. salivarius*, konnte eine inhibitorische Wirkung auf das Invasionsverhalten von *Salmonella enteritidis*, *L. monocytogenes*, *E. coli* und *C. jejuni* nachgewiesen werden, wobei der protektive Effekt bei Kombinationen aus mehreren *Lactobacillales* zunahm (Campana *et al.*, 2017). Als Kommensalen haben Probiotika einen positiven Einfluss auf das gastrointestinale Mikrobiom und inhibieren Pathogene durch Senkung des luminalen pH-Werts, Sekretion von Bakteriocinen und Stimulation der Defensinproduktion in epithelialen Zellen (Sartor, 2005, Corr *et al.*, 2007). Aufgrund ihrer adhärenenten Eigenschaften an Epithelzellen bilden Probiotika eine physikalische Schutzbarriere auf intestinalen Epithelzellen und vermindern so die

Adhäsion von *C. sakazakii* um bis zu 40 % (Collado *et al.*, 2007). Die stammspezifische Bildung von Ko-Aggregaten mit Pathogenen stellt einen weiteren protektiven Mechanismus dar, um die Kolonisation von Pathogenen zu verhindern (Reid *et al.*, 1988, Schellenberg *et al.*, 2006, Collado *et al.*, 2007).

III. MATERIAL UND METHODEN

1. Material

1.1. Bakterienstämme

Tabelle 1: In dieser Arbeit verwendete Bakterien-Stämme.

Stamm	Genotyp/ relevante Eigenschaften	Herkunft/Referenz
<i>Cronobacter sakazakii</i> :		
ES 5	Wildtyp; humanes Isolat (no neonate)	Hartmann <i>et al.</i> , 2010, Johler <i>et al.</i> , 2010
ES 5 Δ wzx	in-frame Deletion des wzx- Gens	K. Schauer, unveröffentlicht
ES 5 ^{Amp}	Derivat von ES 5, Amp ^R , pDiGi	K. Schauer, unveröffentlicht
ATCC 12868; MHI 21122	Kapselbildner; Herkunft unbekannt	Baldwin <i>et al.</i> , 2009
MHI 21029	Humanes Isolat, Neonaten	^b
MHI 21029 Δ wzx	in-frame Deletion des wzx- Gens	K. Schauer, unveröffentlicht
ATCC 29544; MHI 975	Humanes Isolat	Lai, 2001, Corti <i>et al.</i> , 2007
NCTC 8155; MHI 977	Trockenmilchprodukt (tin of dried milk)	Lai, 2001
MHI 988	Säuglingsnahrung	^a
MHI 989	Säuglingsnahrung	^a
MHI 995	Säuglingsnahrung	^a
MHI 996	Säuglingsnahrung	^a
MHI 998	Säuglingsnahrung	^a
MHI 21000	Säuglingsnahrung	^a
MHI 21001	Säuglingsnahrung	^a
MHI 21030	Humanes Isolat, Neonaten	^b
MHI 21032	Humanes Isolat	^c

Stamm	Genotyp/ relevante Eigenschaften	Herkunft/Referenz
ATCC BAA894 MHI 21039	Humanes Isolat, Neonaten	Kuceroval <i>et al.</i> , 2010, Himelright <i>et al.</i> , 2002
MHI 21037	Humanes Isolat, Neonaten	^b
MHI 21086	Milchpulver	^a
ATCC 29544; MHI 21090	Humanes Isolat; Kehlkopf	Iversen <i>et al.</i> , 2008, Baldwin <i>et al.</i> , 2009
MHI 21098	Milchpulver	^b
MHI 21172	Säuglingsnahrung	^a
<i>Cronobacter turicensis</i>:		
LMG 23827 ^T	Humanes Isolat, Neonaten (Blut)	Iversen <i>et al.</i> , 2008, Stephan <i>et al.</i> , 2011
<i>Listeria monocytogenes</i>:		
EGD	<i>Listeria monocytogenes</i> Sv 1/2a, Wildtyp	Max-Planck-Institut, Berlin; Kaufmann 1993
EGD- <i>gfp</i>	Kan ^R , EGD::pIMK2- <i>gfp</i>	K. Schauer, unveröffentlicht
<i>B. cereus</i>:		
F837/76, DSM 4222 (MHI 162)	Postoperative Infektion Toxinprofil: ces ⁻ , nhe ⁺ , hbl ⁺ , cytK ⁻	Beecher <i>et al.</i> , 1990
<i>Lactobacillus spp.</i>:		
<i>L. casei</i> MHI 484		45_2, SKW, B900
<i>L. rhamnosus</i> MHI 486		Wisby BioProfit (1-1); LC 705 Misirlilar <i>et al.</i> , 2012
<i>L. helveticus</i> MHI 496		(40_3/40_4), Wisby

^a Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch, Ludwig-Maximilians-Universität München^b Institut für Lebensmittelsicherheit und -hygiene, Universität Zürich^c Institut für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde, Justus-Liebig-Universität Gießen

1.2. Zelllinien

Tabelle 2: In dieser Arbeit verwendete Zelllinien.

Zelllinie	relevante Eigenschaften	Herkunft
Caco-2	Humane, epitheliale Dickdarmadenokarzinomzellen	DSMZ Nr.: ACC 169
Vero	Nierenepithelzellen der Grünen Meerkatze	BioWhittaker (ATCC-CCL-81)
HT-29	Humane, epitheliale Dickdarmadenokarzinomzellen	ATCC® HTB-38™

1.3. PCR-Primer

Tabelle 3: In dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotid-Primer.

Primer	Sequenz 5'→ 3'	Referenz
EsAgf	TGAAAGCAATCGACAAGAAG	Lehner <i>et al.</i> , 2006
EsAgr	ACTCATTACCCCTCCTGATG	Lehner <i>et al.</i> , 2006
<i>bcsA</i> -cz1sF	GATTTTCGACTGCGACCACGTS	Hu <i>et al.</i> , 2015
<i>bcsA</i> -cz1sR	ACATGTCGTTRCCRTCCTGCAC	Hu <i>et al.</i> , 2015
<i>bcsB</i> -cz1sF	GCAGATTTTCCGYCTCGAYAAC	Hu <i>et al.</i> , 2015
<i>bcsB</i> -cz1sR	CSACRTACTCTTCTTCCACCAG	Hu <i>et al.</i> , 2015
<i>bcsC</i> -cz4sF	CAGCAGGCGGTTGCAGACSTATC	Hu <i>et al.</i> , 2015
<i>bcsC</i> -cz4sR	TAGCCAATCGGSCCSAGATCGCT	Hu <i>et al.</i> , 2015

1.4. Enzyme und Enzymreaktionspuffer

Tabelle 4: In dieser Arbeit verwendete Enzyme und Enzymreaktionspuffer.

Enzym	Bezugsquelle
Reaction Buffer IV (10x), MgCl ₂ (25mM)	Thermo Scientific
ThermoPrime Taq-DNA-Polymerase	Thermo Scientific
Catalase from bovine liver	Sigma-Aldrich
Proteinase K	Roth
Pepsin from porcine gastric mucosa (> 250 U/mg)	Sigma-Aldrich
Lipase from porcine pancreas	Sigma-Aldrich
Galle	Fluka

Pancreatin from porcine pancreas	Sigma-Aldrich
RNase	Roth

1.5. Chemikalien und Kits

Tabelle 5: In dieser Arbeit verwendete Chemikalien.

Bezugsquelle	Chemikalien
Biochrom	Fetales Kälberserum FCS, Natriumpyruvat, PBS Dulbecco, PBS mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$, RPMI 1640, Plastik für die Zellkultur
Fluka	Isopropanol, Natronlauge, Salzsäure, Tryptone enzymaticdigest from casein
Merck	Calciumchlorid, Coomassie-Blau, Brain heart infusion (BHI), Salzsäure (HCl) 1 M, Kristallviolett
Oxoid	Bacteriological Agar, Caseinhydrolysat, chromogenic cronobacter isolation agar (CCI), Müller Hinton Broth, de Man Rogosa Sharpe (MRS)-Medium/Agar, Peptonwasser, Yeast extract
peqlab	Agarose peq GOLD
Qiagen	QUIquick® PCR Purification Kit
Riedel-de Haen	Natriumphosphat
Roche	Cell Proliferation Reagent WST-1
Roth	Ampicillin, Anthron, 8-Hydroxichinolin, D-(+)-Maltose-Monohydrat, Gentamycinsulfat, Mitomycin, Kaliumchlorid, Kanamycinsulfat, Kongorot,
Sigma-Aldrich	Ammonium Eisen(III)-citrat, Ammoniumsulfat, Citronensäure-Monohydrat, D-(+)-Glucose-Monohydrat, Dikaliumhydrogenphosphat, Dinatriumhydrogenphosphat, 8-Hydroxyquinoline, Kaliumdihydrogenphosphat, Magnesiumchlorid, Magnesiumsulfat, Methanol, MOPS, Natriumchlorid, Natriumdesoxycholat, Natriumpyruvat, Propidiumiodid, Schwefelsäure, Sigma Gen Elute™ Plasmid Miniprep Kit I, Thioharnstoff, Trichloressigsäure, TritonX-100, Trypanblau, Trypsin-EDTA-Lösung
Thermo Fisher Scientific	Ladepuffer (6x), Syto® 9 green fluorescent nucleic acid stain (Invitrogen™), O' Gene Ruler DNA Ladder Mix
VWR	Chloroform

1.6. Nährmedien

Für die in dieser Arbeit verwendeten Nährmedien wurden die Substanzen in A. dest. gelöst, ggf. der pH-Wert eingestellt und 15 Minuten bei 121°C autoklaviert. Nach Abkühlung auf 50°C wurden weitere Zusätze wie Antibiotika steril zugesetzt.

LB (Luria-Bertani)	10 g Trypton aus Casein 5 g Yeast-Extrakt 5 g NaCl auf 1 l mit A. dest. auffüllen, pH 7,5 Festmedium: 15 g Agar zugeben
Minimalmedium M9	6 g Na ₂ HPO ₄ 3 g KH ₂ PO ₄ 3 g NaCl 2 g (NH ₄) ₂ HSO ₄ 2 mM MgCl ₂ 0,1 mM CaCl ₂ 3 µM FeCl ₃ x 6 H ₂ O 0,4 % Maltose auf 1 l mit A. dest. auffüllen Festmedium: 15 g Agar } sterilfiltrieren
BHI (<i>Brain Heart Infusion</i>)	37 g BHI auf 1 l mit A. dest. auffüllen Festmedium: 15 g Agar zugeben Weichagar: 7 g Agar zugeben
CCI-Agar (<i>Chromogenic Cronobacter Isolation Agar</i>)	30,6 g CCI-Agar Auf 1 l mit A. dest. auffüllen
CGY (Caseinhydrolysat-Bouillon)	20 g Caseinhydrolysat 6 g Hefe 2 g (NH ₄) ₂ SO ₄ 6 g KH ₂ PO ₄ 14 g K ₂ HPO ₄ 1 g Natriumcitrat 2 g Magnesiumsulfat 1 % Glucose (steril filtriert) auf 1 l mit A. dest. auffüllen
Milch-Agar	0,4 g (NH ₄) ₂ SO ₄ 40 ml A. dest. 200 ml Milupa Aptamil Pronutra Pre trinkfertige Anfangsmilch Festmedium: 3,6 g Agar zugeben
CRA (Kongorot-Agar)	10 g Caseinhydrolysat 1,5 g Hefe 0,4 ml 1M MgSO ₄ 8 ml Kongorot (0,5 % in 50 % EtOH) 3,25 ml Coomassie Blau (0,3 % in 50 % EtOH) Auf 1 l mit A. dest. auffüllen Festmedium: 15 g Agar zugeben
MRS-Medium (De Man Rogosa Sharpe)	52 g MRS Auf 1 l mit A. dest. auffüllen

MRS-Agar (De Man Rogosa Sharpe)	62 g MRS Auf 1 l mit A. dest. auffüllen
BPW (Buffered Peptone Water; Gepuffertes Peptonwasser)	20 g Peptonwasser 3,5 g Na ₂ HPO ₄ 1,5 g KH ₂ PO ₄ Auf 1 l mit A. dest. auffüllen
Alkalische Lösung	150 ml NaOH (1 M) 14 g NaH ₂ PO ₄ Auf 1 l mit A. dest. auffüllen

Säuglingsnahrung:

Aptamil Pro futura TM Pre (Milupa)	} Je 1 g in 7 ml BPW lösen
Alete Anfangsmilch 1(Alete)	
Milumil Folgemilch 2 (Milupa)	
Folgemilch 2 (Babylove ^{dm})	
SINLAC Spezialbrei (Nestlé BEBA [®])	

1.7. Antibiotika-Zusätze zu den Nährmedien

Tabelle 6: In dieser Arbeit verwendete Antibiotika.

Antibiotikum	Lösungsmittel	Konzentration
Ampicillin (Amp)	H ₂ O	100 µg/ml
Gentamycin (Gm)	H ₂ O	10-100 µg/ml
Kanamycin (Kan)	H ₂ O	50 µg/ml

1.8. Medien und Lösungen für die Zellkultur

RPMI-Komplettmedium	500 ml 50 ml	RPMI 1640 mit stabilem Glutamin FCS
MEM-Earle's Komplettmedium	500 ml 5 ml 5 ml	MEM Earle Medium FCS 1 mM/l Natriumpyruvat
PBS	8 g 0,2 g 0,2 g 1,26 g	NaCl KCl KH ₂ PO ₄ Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O Auf 1 l mit A. dest. auffüllen, pH 7,0

PBS mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$	0,1 g 0,1 g	CaCl_2 MgCl_2
Trypsin/EDTA-Lösung	0,05 % 0,02 %	Trypsin EDTA
Trypanblaulösung	0,1 %	Trypanblau in PBS
Lösung A	5 ml 20 ml	FCS RPMI 1640 mit stabilem Glutamin
Lösung B	5 ml 15 ml 5 ml	FCS RPMI 1640 mit stabilem Glutamin DMSO
DAPI-Lösung	0,5 g/ml	DAPI

1.9. Puffer und Lösungen

1.9.1. Puffer und Lösungen zur DNA-Isolierung

Lyse-Puffer	100 mM 5 mM 200 mM	Tris-HCl, pH 8,0 EDTA NaCl
Lysozym	10 mg/ml Stock	Endkonzentration: 2 mg/ μl
SDS	10 %	
Proteinase K	10 mg/ml Stock	Endkonzentration: 0,1 mg/ml
Isopropanol	100 %	
Ethanol	70 % / 96 %	
TE-Puffer (10x)	10 mM 1 mM	Tris-HCl EDTA pH 7,4
RNase	10 mg/ml Stock	Endkonzentration: 0,02 mg/ml

1.9.2. Puffer und Lösungen für Agarosegelelektrophorese

Agarose	0,8-1,5 % (w/v)	Agarose in TAE (1x) aufkochen
TAE (50x)	2 M 50 mM	Tris-Base EDTA mit Essigsäure pH 8,0 einstellen, mit A. dest. auf 1 l auffüllen
Ethidiumbromidlösung	10 mg/ml in A. dest.	
Ladepuffer		Blue Loading Buffer 6x (Thermo Scientific)

DNA-Längenmarker

1 kb O'Gene Ruler DNA Ladder Mix
(Thermo Scientific)

1.9.3. Lösungen zur Resuspendierung von Zellen

PBS-Puffer	8 g	NaCl
	0,2 g	KCl
	0,2 g	KH ₂ PO ₄
	1,26 g	Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O
		pH 7,0

1.10. Verbrauchsmaterialien

Zellkultur:

Zellkulturflaschen aus Kunststoff, 25 cm², (Thermo Fisher, 156367)

Zellkulturflaschen aus Kunststoff, 80 cm² (Thermo Fisher, 178905)

Multidish 6 well, Nunclon Delta SI (Nunc, 119847)

Multidish 24 well, (Thermo Fisher, 142475)

Lab-Tek Chamber SlidesTM, 8 Kammern (Nunc, 177402)

PCR:

PCR Tubes, 0,2 ml (Peglab, 820337-A)

Sonstige:

AnaeroGenTM 2,5 l (Thermo scientific, AN0025A)

Kryotubes 1,8 ml (Thermo Fisher, 375418)

Deckgläschen

Dialyseschläuche Ø16 mm (Serva, 44110.04)

Eppendorf Reaktionsgefäße 2,0 ml (Eppendorf, 0030 120.094)

Eppendorf Reaktionsgefäße 1,5 ml (Eppendorf, 0030 120.086)

Eppendorf Reaktionsgefäße 0,5 ml (Eppendorf, 0030 121.023)

Mikrotiter-Platten (Roth, 9293.1)

Mörser mit Pestill aus glasiertem Porzellan mit rauer Reibefläche (Roth, 1567.1)

Petrischalen 60 x 15 mm, 94 x 16 mm (Greiner bio-one, 628102, 633102)

pH-Indikatorpapier (Merck, 1.09526)

Pipettenspitzen 0,5-20 µl, 2-200 µl, 50-1000 µl (Brand, 732024, 732028, 732032)

Quadratische Petrischalen 120 x 120 x 17 mm (Greiner bio-one, 68816)

Schraub-Röhrchen, steril, 15 ml & 50 ml (Greiner bio-one, 188271, 227261)

Sterilfilter Millex-GV Filter Unit 0,22 µm (Merck Millipore, SLGV033RB)

UV- Küvetten (Brand, 759210)

Variable Zwölfkanalpipette 30 - 300 µl; 10-100 µl (Eppendorf)

Zählkammer nach Thoma (Brand)

1.11. Geräte

Tabelle 7: In dieser Arbeit verwendete Geräte.

Gerät	Name	Hersteller
Autoklav	Varioklav Dampfsterilisator	H+P Labortechnik
CO ₂ -Inkubator	Hera Cell 150	Heraeus
Fluoreszenzmikroskop	BZ-8000K	Keyence
Gelelektrophorese-Kammer	Class II Model 40-0911	Peqlab
Heizblock	Thermomixer comfort	Eppendorf
Hybridisierungssofen	HB-1000 Hybridizer	UVP Laboratory Products
Mikroskop	Inverses Mikroskop	Zeiss
pH-Meter		InoLab
Schüttelinkubator	Controlled Environment Incubator Shaker	New Brunswick Scientific Co. Inc.
Schüttelinkubator	CERTOMAT® MOII	Sartorius
Spektrophotometer	BioPhotometer	Eppendorf
Sterilbank	Sterilwerkbank HERA-Safe	Heraeus
Taumelschüttler	Polymax 1040	Heidoph
Tecan-Reader Spectra	Tecan	Tecan Deutschland
Thermocycler	TProfessional Standard	Biometra
Tischzentrifuge	Biofuge pico	Heraeus
UV-Kamera	Transilluminator	biostep
Vortexer	Vortex-2 Genie	Scientific Industries
Waage		Sartorius
Zentrifuge	Varifuge 3.0R	Heraeus Sepatech

1.12. Software

Argus X1, Bio-Imaging-Control-Software (biostep)

Ridawin (R-Biopharm AG)

Bildanalyse Software, BZ-Analyser für Fluoreszenzmikroskop (Keyence)

2. Methoden

2.1. Mikrobiologische Methoden

2.1.1. Kultivierung von Bakterien

Die Anzucht von *C. sakazakii* erfolgte auf festem oder in flüssigem LB-Medium, ggf. unter Zusatz von Antibiotika, bei 37 °C im Brutschank oder Schüttler (250 rpm) über Nacht.

L. monocytogenes wurde auf festem oder in flüssigem BHI-Medium, ggf. unter Zusatz von Antibiotika, bei 37 °C im Brutschrank oder Schüttler (250 rpm) unter aeroben Bedingungen angezogen.

B. cereus F837/76 (MHI 162) wurde auf festem BHI-Medium bei 37 °C im Brutschrank angezogen. Zur Herstellung einer enterotoxinhaltigen Kultur wurde der Stamm in CGY-Bouillon inokuliert und bei 32 °C und 200 rpm für 17 Stunden im Luftschüttler inkubiert.

Die Anzucht von *Lactobacillus* spp. erfolgte auf festem MRS-Medium unter anaeroben Bedingungen bzw. in flüssigem MRS-Medium im Schüttler (250 rpm) unter microaerophilen Bedingungen bei 37 °C für 24 Stunden. Hierfür wurden die 15 ml-Schraubenröhrchen mit MRS-Medium vollständig gefüllt, fest und luftdicht verschlossen. Zur Herstellung zellfreier Kulturüberstände wurden die Bakterienkulturen bei 5000 x g für 10 min zentrifugiert, die Überstände durch einen 0,22 µm Filter steril filtriert und anschließend bei 121 °C für 15 min autoklaviert.

2.1.2. Biofilmproduktion

2.1.2.1. Biofilmbildung auf Festmedium

- Eine Kolonie fraktioniert auf LB-/Minimalmedium-/Milch-Agar ausstreichen
- Bei RT bzw. bei 37 °C für 24-72 h inkubieren
- Phänotypische Beurteilung der Biofilmbildung

2.1.2.2. Biofilmbildung in Flüssigmedium

- 5 ml LB-Medium mit einer Einzelkolonie inokulieren und ü/N bei 37 °C und 250 rpm inkubieren
- 20 ml Minimalmedium mit 2×10^8 CFU inokulieren
- Inkubation bei RT auf einem Taumelschüttler für 48 h

2.1.2.3. Auftrennung des Biofilms in Aggregatzellen und planktonische Zellen

- Biofilmkultur wie unter 2.1.2.2 herstellen
- Bakterienkultur bei RT für 10 min bei 210 g zentrifugieren
- Planktonische Zellen abnehmen
- Pellet in 1 ml PBS resuspendieren und bei 10.000 g für 30 Sekunden abzentrifugieren
- Überstand verwerfen
- Pellet in 1 ml PBS resuspendieren und 1 min in einem Mörser mit Pestill zerkleinern, um Aggregatzellen zu vereinzeln
- Verdünnungsreihe bis 10^{-11} anlegen und Verdünnungsstufen 10^{-6} bis 10^{-12} auf LB-Platten ausplattieren
- LB-Platten bei 37 °C ü/N inkubieren, anschließend CFU bestimmen

2.1.2.4. Nachweis von Zellulose im Biofilm auf Kongo-Rot-Agar (CRA) (nach Suppiger *et al.*, 2016)

- Biofilmkultur wie unter 2.1.2.2 herstellen
- 100 µl der ÜNK in 5 ml Minimalmedium überimpfen
- bei 37 °C im Schüttler bis zur OD₆₀₀ von 1,0 anziehen
- 5 µl auf CRA-Platte geben und 3 d bei RT inkubieren

2.1.3. Induktion und Reaktivierung des VBNC-Stadiums**2.1.3.1. Induktion des VNBC-Stadiums**

- Auftrennung des Biofilms in Aggregatzellen und planktonische Zellen wie unter 2.1.2.3
- Suspensionen von Aggregatzellen und planktonischen Zellen auf 10^9 CFU/ml einstellen und 200 µl/Well in eine 24-Well Platte geben
- 24-Well Platte unter Sterilbank lufttrocknen lassen bis Flüssigkeit vollständig verdunstet ist
- 24-Well Platte abgedunkelt bei RT für 4 Monate lagern

Nach 4 Monaten werden die Bakterien in den Wells rehydriert, auf LB-Agar ausplattiert und ü/N bei 37 °C inkubiert. Ist am nächsten Tag kein Wachstum sichtbar, so sind die Bakterienzellen in den VBNC-Zustand übergegangen. Zur Verifizierung des VBNC-Zustands, werden die Bakterien mittels Lebend-Tod-Färbung angefärbt und mikroskopiert. Die VBNC-Zellen erscheinen, wie auch vitale und kultivierbare Bakterienzellen der ÜNK,

als grün-leuchtende Stäbchen unter dem Fluoreszenz-Mikroskop.

2.1.3.2. Reaktivierung in Flüssigmedium

- 0,5 ml/Well Medium zugeben und bei 37 °C über einen Zeitraum von 30 h inkubieren
- alle 2 h Verdünnungsreihe anlegen und auf LB-Platten ausplattieren
- LB-Platten bei 37 °C ü/N inkubieren, anschließend CFU bestimmen
- als Medien werden Magermilch, BPW, Minimalmedium, trinkfertige Säuglingsanfangsmilch und Caco-2-Zellüberstand verwendet

2.1.3.3. Reaktivierung in modifizierten Standard-Nährmedien (nach Weber *et al.*, 2009)

- 0,5 ml/Well Flüssigmedium (BPW, MM, Magermilch) mit Zusatz von 40 µM 8-Hydroxyquinoline und 0,25 mg Ammoniumeisen(III)-citrat zugeben und für 30 d inkubieren
- alle 24 h auf CCI-Agar ausplattieren
- CCI-Agarplatten bei 37 °C ü/N inkubieren, anschließend auf Koloniewachstum überprüfen

2.1.3.4. Reaktivierung unter Zusatz von Katalase

Methode A:

- 0,5 ml/Well BPW mit 200 U Katalase zugeben und 16-24 h bei 37 °C ohne Schütteln inkubieren
- Trübung beobachten

Methode B:

- 0,3 ml/Well BPW zugeben und 2 h bei 37 °C ohne Schütteln inkubieren
- 2000 U Katalase auf eine CCI-Agarplatte ausplattieren, einziehen lassen
- Wells mit VBNC-Zellen durch Auf-und Abpipettieren gründlich ausspülen und gesamte 0,3 ml auf CCI-Katalase-Platte ausplattieren
- bei 37 °C ü/N inkubieren, anschließend CFU bestimmen

2.1.3.5. Reaktivierung unter *in vitro* Simulation neonataler Magen-Darm-Bedingungen (modifiziert nach Buriti *et al.*, 2010)

- 0,5 ml/Well trinkfertige Säuglingsanfangsmilch zugeben und 2 h bei 37 °C inkubieren

- VBNC-Zellen durch Auf-und Abpipettieren vom Well lösen
- 9,5 ml trinkfertige Säuglingsanfangsmilch in ein 50 ml Greiner-Röhrchen geben und den pH-Wert auf 5 mit 0,1 M HCl einstellen
- 0,5 ml abgelöste VBNC-Zellen zugeben

Magen (t=0)

- Zugabe von 0,003 g/ml porcines Pepsin (70 U) gelöst in HCl (0,1 M), Greinerröhrchen invertieren
- 0,0009 mg/ml Lipase zugeben, Greinerröhrchen invertieren und 2 h bei 37 °C und 150 rpm im Luftschüttler inkubieren

Enterische Phase 1 (t=2 h):

- 0,01 g/ml bovine Galle zugeben und invertieren
- 0,001 g/ml porcines Pankreatin (gelöst in alkalischer Lösung) zugeben
- 2 h bei 37 °C und 150 rpm im Luftschüttler inkubieren

Enterische Phase 2 (t=4 h):

- pH-Wert mit alkalischer Lösung auf 7,1 einstellen
- Konzentration an boviner Galle (0,01 g/ml) und porcinem Pankreatin (0,001 g/ml) an neues Gesamtvolumen anpassen
- 20 h bei 37 °C und 150 rpm inkubieren
- ab t=17 h alle 2 h jeweils 200 µl Probe entnehmen, bis 10^{-7} in PBS verdünnen und auf CCI-Platten ausplattieren
- Platten ü/N bei 37 °C inkubieren, anschließend CFU bestimmen

2.2. Molekulargenetische Methoden

2.2.1. DNA-Isolierung

2.2.1.1. Präparation von genomischer DNA

- 1,5 ml ÜNK bei 16.000 g für 2 min abzentrifugieren
- Pellet in 400 µl Lyse-Puffer resuspendieren
- 100 µl Lysozym (10 mg/ml) zugeben, invertieren und für 15 min auf Eis inkubieren
- 10 µl SDS (10 %) und 5 µl Proteinase K (10 mg/ml) zugeben und invertieren
- Inkubation bei 55 °C im Hybridisierungssofen oder im Thermoblock ü/N
- Zugabe von 500 µl Isopropanol zur Fällung der DNA, invertieren

- DNA 2 x mit 500 µl 96 % Ethanol und 70 % Ethanol waschen
- DNA in ein neues Eppendorfgefäß überführen und im Heizblock lufttrocknen
- in 200-300 µl TE-Puffer pH=7,4 mit 1 µl RNase (10 mg/ml) resuspendieren

2.2.1.2. Präparation von genomischer DNA (*quick version*)

- Bakterienmaterial vom Festmedium in ein Eppendorfgefäß überführen
- in 200 µl A. dest. resuspendieren
- 5 min bei 100 °C kochen
- 5 min bei 16.000 g zentrifugieren
- Überstand abnehmen und im Verhältnis 1:2 mit Roti-Chloroform II mischen (invertieren bis milchige Lösung entsteht)
- 10 min bei 16.000 g und 4 °C zentrifugieren
- obere wässrige Phase vorsichtig abnehmen und in ein neues Eppendorfgefäß geben

2.2.1.3. Präparation von Plasmid-DNA

- die Plasmidisolierung erfolgte mit Sigma Gen Elute TM Plasmid Miniprep-Kit
- Plasmid-DNA wurde mit 65 µl A. dest. von der Säule eluiert und ihre Konzentration photometrisch bestimmt
- die Lagerung erfolgte bei -20°C

2.2.2. Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentrationsbestimmung einer wässrigen DNA-Lösung erfolgt mittels photometrischer Messung der optischen Dichte bei $\lambda=260$ nm. Bei dieser Wellenlänge weisen die Nucleinsäuren ihr Maximum auf, welches durch die aromatischen Ringe der Basen hervorgerufen wird. Eine OD_{260} von 1 entspricht einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml bei doppelsträngiger DNA. Die Reinheit der Lösung wird durch den Quotienten DNA-/Proteingehalt (OD_{260}/OD_{280}) ausgedrückt, der bei einer reinen DNA-Lösung 1,7-2,0 beträgt.

2.2.3. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion ermöglicht es, selektiv bestimmte DNA-Fragmente genomischer DNA bzw. Plasmid-DNA zu vervielfältigen. Mittels zweier Oligonukleotid-Primer, die sich am 5' Ende der DNA-Einzelstränge anlagern, einer hitzestabilen DNA-

Polymerase und dNTPs werden komplementäre Enden synthetisiert.

Standard-PCR-Ansatz:

- 2-100 ng Template
- 5 µl PCR-Puffer (10x)
- 3 µl MgCl₂ (25 mM)
- 1 µl dNTPs (40 mM)
- je 2 µl Primer (10 pmol/µl)
- 0,1 µl *Taq* DNA-Polymerase (5 U/µl)
- ad 50 µl A. dest.

Standard-PCR-Bedingungen:

- 95 °C	5-10 min	1x	initiale Denaturierung
- 95 °C	30-60 s	} 25-30 x	Denaturierung
- T _A	40 s		Annealing
- 72 °C	t _E		Elongation
- 72 °C	5 min	1x	finale Elongation

Die Annealingtemperatur T_A richtet sich nach der Schmelztemperatur der Primer und liegt 0,5 °C-5 °C unter diesem Wert. Die Schmelztemperatur der Primer richtet sich nach der Art und der Anzahl der Basenpaare und kann mittels folgender vereinfachter Gleichung berechnet werden:

$$T_M = 2^{\circ}\text{C} \times (\text{A}+\text{T}) + 4^{\circ}\text{C} \times (\text{G}+\text{C})$$

Abhängig von der Länge des zu amplifizierenden Fragments und der Geschwindigkeit der DNA-Polymerase wird die Elongationszeit festgelegt. Die *Taq*-DNA-Polymerase amplifiziert 1 kb in 1 min.

2.2.3.1. PCR mit ganzen Zellen als Template

- 1-3 Kolonien von einer ü/N inkubierten Festagarplatte mit Selektivmedium in 100 µl A. dest. resuspendieren
- 10 min bei 100 °C kochen
- 2 min bei 10.000 g zentrifugieren
- Überstand abnehmen und als Template einsetzen

2.2.4. Techniken zur Charakterisierung von DNA-Molekülen

2.2.4.1. Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese ist eine Methode zur Auftrennung und somit zur Charakterisierung der DNA entsprechend ihrer Fragmentlänge (Anzahl an Basenpaaren) und ihrer Konformität. Da die Phosphatreste der DNA negativ geladen sind, wandert diese im elektrischen Feld vom Minus- zum Pluspol. Dabei ist die Wandergeschwindigkeit abhängig von der Konzentration des Agarosegels. Mit steigender Konzentration des Gels (0,8 %- 1,5 %) wird die Netzstruktur dichter und die Wandergeschwindigkeit der Fragmente nimmt abhängig von der Fragmentgröße und aufgrund des zunehmenden mechanischen Widerstands ab. Somit werden kurze Fragmente in höher konzentrierten Agarosegelen gut aufgetrennt und lange DNA-Fragmente in niedrig konzentrierten.

- Agarose in TAE-Puffer in der gewünschten Konzentration aufkochen
- in einen Gelträger mit eingesetztem Kamm gießen und abkühlen lassen bis das Gel fest ist (ca. 20 min)
- in eine mit TAE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer einsetzen und den Kamm entfernen
- DNA-Proben mit Gel-Lade-Puffer (6x) versetzen und die Geltaschen mit den Proben beladen
- Längenmarker mit definierten Bandengrößen in die äußeren Geltaschen auftragen
- Auftrennung bei einer Spannung von 90-120 V (je nach Gelkonzentration), 400 mA, 80 W
- Färben des Gels mit Ethidiumbromidlösung, anschließend kurz im Wasserbad waschen
- unter UV-Licht ($\lambda=320$ nm) fotografieren

2.3. Allgemeine biochemische Methoden

2.3.1. Kristallviolett-Färbung (modifiziert nach Hartmann *et al.*, 2010)

Die Kristallviolett-Färbung ist eine Methode, die es ermöglicht, den an abiotischen Oberflächen gebundenen Biofilm mittels photometrischer Messung zu quantifizieren. Dazu wird eine ÜNK in einer 96-Well Mikrotiter-Platte unter standardisierten Bedingungen kultiviert und anschließend mit 0,1 % iger Kristallviolett-Lösung angefärbt. Der basische Farbstoff bindet dabei an negativ geladene Oberflächenmoleküle, u.a. auch Polysaccharide,

und färbt dadurch die Matrix/Biofilm sowie lebende und tote Zellen an.

- in 5 ml Minimalmedium eine Einzelkolonie animpfen und bei 30°C/200 rpm im Luftschüttler ü/N inkubieren
- ÜNK 1:100 in Minimalmedium verdünnen
- 100 µl/Well von der 10⁻² Verdünnung in eine 96-Well Mikrotiter-Platte geben und bei RT für 48 h inkubieren
- Option mit DNase-/Proteinase K-Behandlung (nach Fernandez Ramirez *et al.*, 2015):
 - o planktonische Zellen abnehmen
 - o 1 x mit PBS waschen
 - o 100 µl PBS/Well (=Kontrolle) bzw. 100 µl PBS mit 100 µg/ml (Endkonz.) DNase I oder 10 µg/ml (Endkonz.) Proteinase K zugeben
 - o 1 h bei RT inkubieren
 - o 3 x mit PBS waschen
 - o 100 µl PBS/Well zugeben
- 20 µl/Well von der 0,1 % igen Kristallviolett-Lösung zugeben und 10 min bei RT inkubieren
- planktonische Zellen vorsichtig mit Pipette abnehmen
- 3 x mit PBS waschen und lufttrocknen lassen
- 100 µl/Well von 95 % Ethanol zugeben und 15 min bei RT inkubieren, um das Kristallviolett aus dem Biofilm zu lösen
- die Wells gut resuspendieren
- den Kristallviolettgehalt photometrisch bei 600 nm quantifizieren

2.3.2. Isolierung von extrazellulären Polysacchariden

- 5 ml Minimalmedium mit einer Einzelkolonie animpfen und ü/N bei 30°C und 200 rpm im Luftschüttler inkubieren
- je 200 µl der ÜNK auf quadratische Milchagar-Platten ausplattieren und für 48 h bei RT inkubieren
- Bakterien mit sterilem Schaber von Platte lösen und in ein 50 ml Greiner-Röhrchen geben
- Agarplatte vorsichtig mit 20 ml PBS abspülen, die Flüssigkeit mit einer Glaspipette aufnehmen und ebenfalls in das Greiner-Röhrchen überführen
- Bestimmung des Bakterientiters:

- Greiner-Röhrchen 20 min vortexen oder im Überkopfschüttler schütteln
 - Verdünnungsreihe bis 10^{-9} anlegen und Verdünnungsstufen 10^{-5} bis 10^{-9} auf LB-Platten ausplattieren
 - LB-Platten bei 37 °C ü/N inkubieren, CFU bestimmen
- 10 min bei 5000 rpm und 4°C zentrifugieren
- Überstand abnehmen und in ein neues Greiner Röhrchen überführen, diesen Schritt solange wiederholen, bis sich kein Pellet mehr bildet und der Überstand klar ist
- Pellets für Isolierung von zellgebundenen Exopolysacchariden aufheben
- Überstand durch einen 0,22 µm Filter steril filtrieren
- 3 Vol. eiskaltes 70 % Ethanol zugeben und ü/N bei -20°C inkubieren
- 20 min bei 10.000 g und 4 °C zentrifugieren
- Präzipitat in 1 ml A. dest. resuspendieren
- Suspension mit Lysozym (4 mg/ml) bei 37 °C für 24 h im Heizblock inkubieren
- Trichloressigsäure (TCA)-Fällung (Endkonzentration 20 %) ü/N, um Proteine und Nukleinsäuren zu entfernen
- 1 h bei 20.000 g und 4°C zentrifugieren, Pellet verwerfen
- 3 Vol. eiskaltes 70 % Ethanol zum Überstand geben und ü/N bei -20 °C inkubieren
- 45 min bei 16.000 g zentrifugieren
- Präzipitat in 2 ml A.dest. resuspendieren
- Polysaccharid-Lösung gegen A. dest. über 24 h dialysieren
- Lyophilisierung und Lagerung bei -80 °C

2.3.3. Isolierung von zellgebundenen Exopolysacchariden (EPS)

- Bakterienanzucht und Herstellung von Zellpellets siehe 2.3.2
- Pellets in 20 ml A.dest. vereinen und gut resuspendieren
- Suspension für 5 min bei 100 °C kochen
- 45 min bei 20.000 g und 4 °C zentrifugieren, Pellet verwerfen
- 3 Vol. eiskaltes 70 % Ethanol zugeben und ü/N bei -20 °C inkubieren
- 45 min bei 20.000 g und 4 °C zentrifugieren
- Präzipitat mit A. dest. waschen

- Suspension mit Lysozym (4 mg/ml), DNase (0,5 mg/ml) und RNase (0,5 mg/ml) bei 37 °C ü/N inkubieren
- 45 min bei 20.000 g und 4 °C zentrifugieren
- Präzipitat mit A. dest. waschen und bei 41 °C im Heizblock trocknen
- Lagerung bei -20 °C

2.3.4. Anthrontest

Der Anthrontest ermöglicht einen quantitativen Nachweis vom Gesamtgehalt an Kohlenhydraten. Durch das Erhitzen der Polysaccharid-Proben mit Schwefelsäure, werden Monosaccharide abgespalten, welche unter H₂O-Abspaltung zu Derivaten des Furans reagieren. Diese gehen eine Reaktion mit dem Anthron, einem Aromat, ein und es entsteht Triphenylmethanfarbstoff. Dieser blaue Farbstoff wird photometrisch bei einer Extinktion von $\lambda=630$ nm gemessen.

- 18 ml A.dest. mit 72 ml konzentrierter Schwefelsäure mischen, auf 60 °C abkühlen lassen
- 50 mg Anthron und 1 g Thioharnstoff zugeben, mischen und durch Erwärmen (max. 70 °C) lösen
- 0,05 ml Probe mit 1 ml Anthronlösung durch Vortexen gut mischen
- 1 h auf Eis inkubieren
- 9 min bei 90 °C im Heizblock inkubieren
- Reaktion auf Eis abstoppen
- 200 µl Probe/Well in eine 96-Well Mikrotiter-Platte geben
- Extinktionsmessung bei $\lambda=630$ nm

Anhand einer parallel erstellten Standardkurve kann anschließend die Kohlenhydratkonzentration in der Probe berechnet werden. Dazu wurden Glucosekonzentrationen von 0 mg/ml, 0,025 mg/ml, 0,05 mg/ml, 0,1 mg/ml, 0,15 mg/ml, 0,25 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,7 mg/ml und 1 mg/ml eingesetzt.

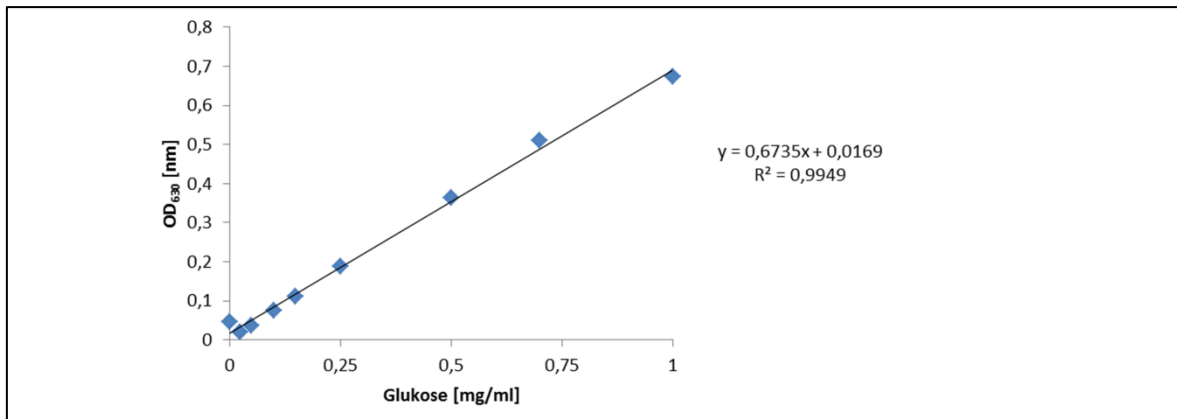


Abb. 2: Glucose-Eichkurve

2.4. Zellkultur

2.4.1. Kultivierung von eukaryotischen Zellen

Die eukaryotischen Zelllinien wurden im begasten Brutschrank bei 7 % CO₂ und 37 °C kultiviert. Die Subkultivierung erfolgte alle 2-3 Tage. Die verwendeten Medien und Puffer wurden zuvor im Wasserbad auf 37 °C erwärmt.

- Medium abnehmen, Monolayer 2 x mit 10 ml PBS waschen
- die eukaryotischen Zellen mit 2 ml Trypsin/EDTA-Lösung benetzen (pro 80 cm²-Zellkulturflasche)
- 5 min bei 37 °C inkubieren, das Ablösen der Zellen makroskopisch und mikroskopisch überprüfen
- 10 ml RPMI-Komplettmedium zugeben
- die Zellen durch Auf- und Abpipettieren resuspendieren und in Greiner-Röhrchen überführen
- 5 min bei 500 rpm zentrifugieren
- Zellpellet in frischem Komplettmedium durch Auf- und Abpipettieren resuspendieren
- Zellsuspension mit frischem Komplettmedium verdünnt in neue Zellkulturflaschen aussäen (je nach Zelllinie zwischen 1:2 und 1:10)
- Zellen durch leichte über Kreuz Bewegungen in der Kulturflasche gleichmäßig verteilen
- im Zellkulturbrutschrank bei 7 % CO₂ und 37 °C inkubieren

In den ersten 4-6 h erfolgt die Adhäsion der Zellen an die Oberfläche. Daher dürfen die Zellen in dieser Zeit keinen Scherkräften ausgesetzt werden.

2.4.2. Einfrieren und Auftauen von eukaryotischen Zellen

2.4.2.1. Einfrieren

- Zellen durch Trypsinieren vom Flaschenboden lösen
- Zellsuspension bei 500 rpm abzentrifugieren, Überstand verwerfen
- Zellpellet in Lösung A resuspendieren: 0,75 ml pro 80 cm²-Zellkulturflasche
- Lösung B (0,75 ml pro 80 cm²-Zellkulturflasche) tropfenweise unter ständigem Schwenken des Greiner-Röhrchens zugeben
- Zellen à 1,5 ml Kryoröhrchen aliquotieren
- ü/N bei -80 °C in einer Kryobox, anschließend bei -80 °C lagern

2.4.2.2. Auftauen

- Zellen bei 37 °C auftauen und sofort in 10 ml Kompletmedium überführen
- Zellsuspension 5 min bei 500 rpm abzentrifugieren, Überstand verwerfen
- Zellpellet in frischem Kompletmedium resuspendieren und in eine Zellkulturflasche überführen
- Zellen werden nach Erreichen der Konfluenz (Monolayer) das erste Mal passagiert

2.4.3. Bestimmung der Lebendzellzahl

Zur Unterscheidung zwischen den lebenden und toten Zellen werden die eukaryotischen Zellen mit dem Farbstoff Trypanblau angefärbt. Dieser besitzt die Eigenschaft, schnell durch die defekte Zellmembran der toten Zellen zu diffundieren und diese blau anzufärben. Lebende Zellen hingegen nehmen den Farbstoff nur sehr langsam auf und lassen sich als helle Zellen deutlich von den toten blauen Zellen differenzieren.

- 50 µl Zellsuspension mit 50 µl 0,1 % iger Trypanblau-Lösung versetzen
- 10 µl in Thoma-Zählkammer geben und die lebenden Zellen auszählen: Vier diagonale Quadrate und ein weiteres Eck-Quadrat
- Berechnung der Lebendzellzahl/ml:

$\text{Lebendzellzahl/ml} = \text{gezählte Zellen} \times \text{Verdünnungsfaktor (2)} \times \text{Kammerfaktor (50000)}$
--

2.5. Methoden zur Analyse des Pathogenitätsverhaltens von *C. sakazakii*

2.5.1. Herstellung von Infektionsaliquots

2.5.1.1. Herstellung des Infektionsaliquots von *C. sakazakii*

- 2 % iges Inokulum der ÜNK herstellen und für 2 h bei 37 °C und 250 rpm inkubieren
- Inokulum bei 2095 g für 10 min zentrifugieren
- Pellet in PBS waschen
- erneut bei 2095 g für 10 min zentrifugieren
- Pellet in FCS-freiem RPMI-Medium resuspendieren: Infektionslösung I
- Infektionslösung II herstellen: Infektionslösung I mit FCS-freiem RPMI verdünnen, sodass sich MOI=10 ergibt:

$$\frac{1}{\text{CFU}} \times \text{Anzahl Zellen pro Well} \times 10$$

2.5.1.2. Herstellung des Infektionsaliquots von *L. monocytogenes*

- ÜNK 1:10 in frischem BHI verdünnen und bei 37 °C und 250 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 1,0 inkubieren
- eine Infektionslösung mit MOI=10 wie unter 2.5.1.1 beschrieben herstellen

2.5.1.3. Herstellung des Infektionsaliquots von *B. cereus*

- 5 ml CGY-Medium mit einer Einzelkolonie animpfen und für 17 h bei 32 °C und 200 rpm im Luftschüttler inkubieren
- eine Infektionslösung mit MOI=10 direkt aus der ÜNK herstellen

2.5.1.4. Herstellung des Infektionsaliquots von *Lactobacillus* spp.

- mit abgeknickter gelber Spitze Kulturmaterial von einer halben MRS-Platte abnehmen und in 15 ml MRS-Medium resuspendieren
- das Greiner-Röhrchen mit Parafilm umwickeln und 24 h bei 37 °C und 250 rpm inkubieren
- vegetative Zellen: Infektionslösung mit einer MOI=100 direkt aus der ÜNK herstellen
- sterile Überstände: ÜNK bei 5000 g für 10 min zentrifugieren, Überstand abnehmen und durch einen 0,22 µm Filter steril filtrieren
- Überstand bei 121 °C für 15 min autoklavieren

Ansatz A:

- sterilen Überstand mit FCS-freiem RPMI 1:5 verdünnen

Ansatz B:

- Überstand mit 0,1 M NaOH auf pH von 7 einstellen und mit FCS-freiem RPMI 1:5 verdünnen

2.5.2. Standard-Gentamicinassay

Um die Kolonisationsfähigkeit (Adhäsion, Invasion und intrazelluläre Proliferation) von *C. sakazakii* zu analysieren, wurde ein Gentamicinassay (*Gentamcin Protection Assay*) gewählt (Jones *et al.*, 1994). Die Assays wurden sowohl mit undifferenzierten (24 h) als auch mit polarisierten (16 d) Caco-2-Zellen und Mukus sezernierenden HT-29-Zellen (3 d) durchgeführt. Darüber hinaus wurde das Kolonisationsverhalten von *C. sakazakii* unter Einwirkung von probiotischen und pathogenen Begleitkeimen untersucht. Nach Bestimmung der CFU zu den einzelnen Zeitpunkten werden die Werte der Adhäsion und der Invasion mit dem Wert der Infektionslösung II ($t=0$) und der Wert der Proliferation mit dem Wert der Invasion ($t=2,5$ h) verrechnet.

- $2,5 \times 10^5$ Zellen/Well in je 1 ml Komplettmedium in eine 24-Well-Platte aussäen
- Inkubation der Zellen im Brutschrank bei 37 °C /7% CO₂ für 22-24 h bei Caco-2-Zellen und für 3 d bei HT-29-Zellen
- Herstellung des Infektionsaliquots
- Zellen 2x mit PBS waschen und mit 0,5 ml der Infektionslösung II infizieren
- Adhäsion ($t=30'$ nach Zugabe der Infektionslösung II):
 - o Monolayer 3x mit PBS waschen
 - o Zellen mit 1 ml eiskaltem 0,1%-Triton X-100 lysieren und gesamtes Zelllysate in ein Eppendorf-Gefäß überführen
 - o Lysat ½ Minute vortexen
 - o Verdünnungsreihe bis 10^{-5} anlegen und die entsprechenden Verdünnungsstufen auf LB-Platten bzw. Selektionsagar ausplattieren
- nach 1,5 h der Infektion Medium entfernen, 2 x mit PBS waschen
- 0,5 ml/Well Gentamycin 50-Lösung (50 µg/ml) in FCS-freiem Medium zugeben
- Zellen bei 37 °C/7% CO₂ im Brutschrank inkubieren

- Invasion (1 h p.i.):
 - Monolayer 2 x mit PBS waschen
 - Zellen mit 1 ml eiskaltem 0,1%-Triton X-100 lysieren und gesamtes Zelllysate in ein Eppendorf-Gefäß überführen
 - Lysat ½ Minute vortexen
 - Verdünnungsreihe bis 10⁻² anlegen und auf LB-Platten bzw. Selektionsagar ausplattieren
- nach 1 h p.i. Medium entfernen
- 0,5 ml/Well Gentamycin 10-Lösung (10 µg/ml) in FCS-haltigem (10 %) RPMI zugeben
- Zellen bei 37 °C/7% CO₂ im Brutschrank inkubieren
- Proliferation (7h/24h/48h/72h p.i.):
 - Monolayer 2 x mit PBS waschen
 - Zellen mit 1 ml eiskaltem 0,1%-Triton X-100 lysieren und gesamtes Zelllysate in ein Eppendorfgefäß überführen
 - Lysat ½ Minute vortexen
 - Verdünnungsreihe bis 10⁻³ anlegen und auf LB-Platten bzw. auf Selektivagar ausplattieren
 - LB-Platten ü/N bei 37 °C inkubieren, anschließend CFU bestimmen
 - bei Proliferationszeitpunkten ab 24 h Gentamycin-haltiges Medium alle 24 h tauschen

Für die Gentamicinassays mit polarisierten Caco-2-Zellen werden 5 x 10⁴ Zellen/Well in je 1 ml Kompletmedium in eine 24-Well-Platte ausgesät und 16 Tage bei 37 °C/ 7 % CO₂ im Brutschrank inkubiert. Alle 2-3 Tage wird das Medium gewechselt. Nach der Ausdifferenzierung der Zellen wird der Gentamicinassay nach dem Standard-Protokoll durchgeführt.

2.5.3. Gentamicin-Invasionsassay mit pathogener Begleitflora

Um den Einfluss der pathogenen Begleitflora auf die Invasivität von *C. sakazakii* ES 5 zu analysieren, wurden die eukaryotischen Zellen mit *B. cereus* oder *L. monocytogenes* vorbehandelt und anschließend ein Gentamicinassay, wie unter Kapitel 2.5.2 beschrieben, durchgeführt. Dazu wurden Infektionsaliquots mit *B. cereus* (siehe Kapitel 2.5.1.3) und *L. monocytogenes* (siehe Kapitel 2.5.1.2) hergestellt und die eukaryotischen Zellen für 5 Minuten mit *B. cereus* bzw. für 30 Minuten mit *L. monocytogenes* vorinkubiert, bevor der Monolayer 3 mal mit PBS gewaschen und mit *C. sakazakii* ES 5 infiziert wurde. In einem

weiteren Ansatz erfolgte nach einer 5-minütigen Vorinkubation der Zellen mit *B. cereus* eine Ko-Infektion mit *C. sakazakii* ES 5 und *L. monocytogenes* EGD-*gfp*.

2.5.4. Gentamicin-Invasionsassay mit probiotischer Begleitflora

Um zu untersuchen, welchen Effekt die probiotische Begleitflora auf die Invasivität von *C. sakazakii* ES 5 hat, wurden die eukaryotischen Zellen mit probiotischen Stämmen vorinkubiert und anschließend ein Gentamicinassay, wie unter Kapitel 2.5.2 beschrieben, durchgeführt. Dazu wurden Infektionsaliquots mit probiotischem Überstand (siehe Kapitel 2.5.1.4) oder mit vegetativen Zellen eines probiotischen Stamms (siehe Kapitel 2.5.1.4) hergestellt und die eukaryotischen Zellen für 2 Stunden bei 37 °C/7% CO₂ inkubiert, bevor eine Infektion mit *C. sakazakii* ES 5 erfolgte. In einem weiteren Ansatz wurde eine Ko-Infektion mit vegetativen Zellen eines probiotischen Stamms (MOI=100) und *C. sakazakii* ES 5 (MOI=10) nach dem Protokoll eines Standard-Gentamicinassays (vgl. Kapitel 2.5.2) durchgeführt.

2.5.5. Gentamicin-Invasionsassay mit VBNC-Zellen

- Caco-2-Zellen, wie unter Kapitel 2.4.1 beschrieben, 1:10 passagieren und 16 d bei 37 °C/7% CO₂ inkubieren
- alle 2-3 d Medium wechseln
- 24 h vor dem Assay das Medium in der Zellkulturflasche durch FCS-freies RPMI-Medium ersetzen und bei 37 °C/7% CO₂ inkubieren
- FCS-freies RPMI-Medium abnehmen und bei 500 rpm für 5 min zentrifugieren
- Überstand in ein neues 50 ml Greiner-Röhrchen überführen
- 0,5 ml/Well Caco-2-Überstand zu VBNC-Zellen geben und bei 37 °C für x-y h je nach Stamm und Subpopulation inkubieren bis 10⁷ CFU/ml erreicht sind
- mit einem sterilen Zellkulturschaber VBNC-Zellen aus mehreren Wells ablösen und in ein Greiner-Röhrchen zusammenfügen
- polarisierte Caco-2 Zellen (16 d) 2 x mit PBS waschen
- 0,5 ml/Well VBNC-Infektionslösung zugeben und bei 37 °C/7% CO₂ inkubieren
- restliche Infektionslösung in eine 24 Well-Platte ohne Caco-2-Zellen geben und unter den gleichen Bedingungen inkubieren

- nach 24 h Überstand abnehmen, Verdünnungsreihe anlegen und Verdünnungsstufen 10^{-2} bis 10^{-6} auf LB-Platten ausplattieren
- Caco-2-Zellen 2 x mit PBS waschen
- ein Drittel der Zellen mit 1 ml eiskaltem 0,1%-Triton X-100 lysieren und gesamtes Zelllysate in ein Eppendorf-Gefäß überführen
- Lysat ½ Minute vortexen
- Verdünnungsreihe bis 10^{-5} anlegen und auf LB-Platten ausplattieren
- zu den übrigen Zellen 0,5 ml/Well Gentamycin 50-Lösung (50 µg/ml) in FCS-freiem Medium zugeben
- Zellen bei 37 °C/ 7% CO₂ für 1 h im Brutschrank inkubieren
- 2. Drittel der Caco-2-Zellen wie oben beschrieben waschen, lysieren, Verdünnungsreihe bis 10^{-3} anlegen und auf LB-Platten ausplattieren
- Zu den restlichen Caco-2-Zellen 0,5 ml/Well Gentamycin 10-Lösung (10 µg/ml) in FCS-haltigem RPMI zugeben
- Zellen bei 37 °C/7% CO₂ für weitere 24 h im Brutschrank inkubieren und anschließend die Bakterienzellen, wie bereits beschrieben, aus den Caco-2-Zellen reisolieren und die CFU bestimmen

2.5.6. Zytotoxizitätstest

Die Zytotoxizität von *B. cereus*-Überständen im Zusammenhang mit seiner Anzucht in unterschiedlichen Nährmedien wurde mittels eines WST-1-Bioassay in Caco-2-Zellen untersucht. Dabei wird durch mitochondriale Enzyme stoffwechselaktiver Zellen das Tetrazoliumsalz WST-1 zu Formazan reduziert und der daraus resultierende Farbumschlag von rosa zu orange bei $\lambda=450$ nm photometrisch gemessen. Die Bestimmung des reziproken Zytotoxizitätstiters erfolgt über diejenige Verdünnungsstufe, bei der die Stoffwechselaktivität um 50 % reduziert ist.

- optische Dichte der ÜNK bei 600 nm im Photometer messen
- 10 ml Medium in steriles 50 ml Kölbchen geben und ÜNK darin bis zu einer OD₆₀₀ von 0,2 verdünnen
- die Kultur bei 32 °C und 200 rpm im Luftschüttler für 1-6 h inkubieren
- für 20 min bei 2095 g und 4 °C zentrifugieren
- Überstand durch einen 0,22 µm Filter steril filtrieren, in WST-1-Bioassay einsetzen oder bei -20 °C lagern

- in eine 96-Well-Mikrotiterplatte 100 µl/Well Medium vorlegen, die äußeren Reihen freilassen
- serielle Verdünnungsreihe des Überstands beginnend bei 1:20 in einer 96-Well-Platte anlegen
- 2×10^4 Zellen/Well in 100 µl Medium zugeben
- 22 h bei 37 °C/7% CO₂ inkubieren
- 100 µl Medium aus jedem Well abnehmen und 10 µl WST-1 zugeben
- 2 h bei 37 °C/7% CO₂ inkubieren
- Photometrische Messung bei 450 nm durchführen

2.6. Wachstumsanalysen

2.6.1. Wachstumsanalyse von *C. sakazakii*-Stämmen

Zur Charakterisierung des Wachstumsverhaltens von *C. sakazakii*-Stämmen mit unterschiedlich starker Biofilmbildung und zur Überprüfung, ob die Deletion des *wzx*-Gens zu einer Beeinträchtigung des Wachstums führt, wurde eine Wachstumsanalyse über 10 Stunden durchgeführt.

- 5 ml LB-Medium mit einer Einzelkolonie animpfen und bei 37 °C und 250 rpm ü/N inkubieren
- photometrische Bestimmung der optischen Dichte bei $\lambda=600$ nm
- Berechnung der gewünschten Start-OD₆₀₀:

$$1/\text{OD}_{600 \text{ aktuell}} \times \text{gewünschte Start-OD}_{600} = \text{Wert/ml}$$

- 50 ml LB-Medium mit einer Start-OD₆₀₀ von 0,01 animpfen, 2-3 Ansätze pro Stamm
- Stündliche OD₆₀₀-Messung bis OD₆₀₀=0,1 erreicht ist, anschließend halbstündliche Messung bis t=10 h durchführen

2.6.2. Wachstumsanalyse von *C. sakazakii* ES 5 bei Ko-Inokulation mit *B. cereus*

Um zu untersuchen, welchen Einfluss *B. cereus* auf das Wachstumsverhalten von *C. sakazakii* ES 5 hat, wurden beide Pathogene mit dem gleichen Ausgangstiter über 5 Stunden in FCS-freiem RPMI-Medium koinokuliert und stündlich die OD₆₀₀ und die CFU bestimmt. Zur Kontrolle wurden beide Stämme unter den gleichen Bedingungen alleine inkubiert.

- 2 % iges Inokulum aus der ÜNK von *C. sakazakii* ES 5 herstellen und für 2 h bei 37 °C und 250 rpm inkubieren

- Inokulum bei 2095 g für 10 min zentrifugieren
- Pellet mit PBS waschen
- erneut bei 2095 g für 10 min zentrifugieren
- Pellet in FCS-freiem RPMI-Medium aufnehmen
- ein Inokulum von *C. sakazakii* und von *B. cereus* in 10 ml FCS-freiem RPMI-Medium mit einer CFU von $7,5 \times 10^7$ pro ml herstellen
- jeweils ein separates Inokulum von *C. sakazakii* bzw. *B. cereus* in 10 ml FCS-freiem RPMI-Medium mit einer CFU von $7,5 \times 10^7$ pro ml herstellen
- 10 ml/Well der Infektionslösung in eine 6 Well-Platte geben und bei 37 °C/7 % CO₂ für 5 h inkubieren
- stündliche Messung der OD₆₀₀ und CFU-Bestimmung
- zur CFU-Bestimmung die Verdünnungsstufen 10^{-3} bis 10^{-6} anlegen und auf CCI-Platten (*C. sakazakii*) bzw. auf LB-Platten (*B. cereus*) ausplattieren

2.6.3. Wachstumsanalyse von *C. sakazakii* ES 5 bei Ko-Inokulation mit probiotischen *Lactobacillus*-Stämmen

Zur Charakterisierung des Wachstumsverhaltens von *C. sakazakii* ES 5 in Anwesenheit von probiotischen Stämmen, wurden die Stämme gleichzeitig in FCS-freiem RPMI-Medium für 2,5 Stunden inkubiert und alle 30 Minuten die CFU bestimmt. Der gewählte Zeitraum für den Wachstumstest entspricht der Invasionszeit von *C. sakazakii* ES 5 in eine eukaryotische Zelle.

- in 2 ml MRS-Medium Kulturmaterial einer Viertel MRS-Platte von *Lactobacillus* spp. resuspendieren und bei 37 °C und 250 rpm für 24 h inkubieren
- 2 % iges Inokulum aus der ÜNK von *C. sakazakii* ES 5 herstellen und für 2 h bei 37 °C und 250 rpm inkubieren
- Inokulum bei 2095 g für 10 min zentrifugieren
- Pellet mit PBS waschen
- erneut bei 2095 g für 10 min zentrifugieren
- Pellet in FCS-freiem RPMI-Medium aufnehmen
- ein Inokulum von *C. sakazakii* ($7,5 \times 10^7$ CFU/ml) und von *Lactobacillus* spp. ($7,5 \times 10^8$ CFU/ml) in 10 ml FCS-freiem RPMI-Medium herstellen

- jeweils ein separates Inokulum von *C. sakazakii* ($7,5 \times 10^7$ CFU/ml) bzw. *Lactobacillus* spp. ($7,5 \times 10^8$ CFU/ml) in 10 ml FCS-freiem RPMI-Medium herstellen
- 10 ml/Well in eine 6 Well-Platte geben und bei 37 °C/7 % CO₂ für 2,5 h inkubieren
- halbstündlich die CFU bestimmen
- zur CFU-Bestimmung die Verdünnungsstufen 10^{-1} bis 10^{-5} anlegen und auf LB-Platten bzw. MRS-Platten ausplattieren

2.6.4. Messung der antimikrobiellen Aktivität von *Lactobacillus* spp. (nach Jacobsen et al., 1999)

- 2 ml MRS-Medium mit Kulturmateriel einer Viertel MRS-Platte von *Lactobacillus* spp. animpfen und für 24 h bei 37 °C und 250 rpm inkubieren
- 5 µl der ÜNK auf kleine MRS-Platten (Ø 60 mm) geben und anaerob bei 37 °C für 24 h inkubieren
- 7 ml BHI-Weichagar (0,7 %) mit 1 % iger *C. sakazakii* ES 5-ÜNK animpfen
- MRS-Platte mit angewachsener *Lactobacillus* spp.-Kultur mit dem Weichagar überschichten und bei 37 °C für 24 h inkubieren
- Messung der Hemmzone

2.6.5. Wachstumsanalyse von *C. sakazakii* ES 5 in Säuglingsnahrung mit Zusatz von *Lactobacillus*-Überständen

- sterile *Lactobacillus*-Überstände wie unter 2.5.1.4 beschrieben, herstellen
- ÜNK von *C. sakazakii* ES 5 bis 10^{-8} in PBS verdünnen
- die Verdünnungsstufen 10^{-7} und 10^{-8} auf LB-Platten ausplattieren und bei 37 °C ü/N inkubieren, um Ausgangsbakterientiter zu bestimmen
- 1 g pulverförmige Säuglingsnahrung in 7 ml BPW lösen
- 2 ml vom sterilen *Lactobacillus*-Überstand zugeben, mischen
- zum Kontrollansatz 2 ml *Lactobacillus*-Überstand durch MRS-Medium ersetzen
- 100 µl von *C. sakazakii*-Kultur (10^{-7} Verdünnung) zu jedem Ansatz zugeben, sodass 1 CFU in 10 ml Säuglingsnahrung enthalten ist, mischen
- Inkubation für 20 h bei 37 °C ohne Schütteln
- 200 µl aus jeder Probe entnehmen und Verdünnungsreihe in PBS anlegen

- Verdünnungsstufen 10^{-5} - 10^{-7} auf CCI-Platten ausplattieren, bei 37 °C ü/N inkubieren und CFU bestimmen

2.6.6. Bestimmung der colony-forming units (CFU)

Die CFU/ml, Kolonie-bildende Einheit pro ml, wurde in dieser Arbeit mit Hilfe des gewichteten Mittelwerts ermittelt. Dabei werden niedrigere Verdünnungsstufen aufgrund des geringeren Verdünnungsfehlers stärker gewichtet, d.h. sie gehen mit einem größeren Anteil in den Mittelwert ein. Nach Anlegen einer logarithmischen Verdünnungsreihe werden mindestens zwei Verdünnungsstufen mehrfach ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Anschließend werden die Kolonien gezählt und die Summe aus allen gezählten Kolonien gebildet. Diese wird durch einen Faktor geteilt, der sich wie folgt zusammensetzt: Die Anzahl der Stellen entspricht der Anzahl der ausplattierten Verdünnungsstufen und der Wert des Faktors setzt sich aus der Anzahl der ausgezählten Platten pro Verdünnungsstufe zusammen. Zum Beispiel bei drei angelegten Verdünnungsstufen, die doppelt ausplattiert werden, ergibt sich der Faktor 222. Anschließend wird mit dem Plattenfaktor (1000 µl/ausplattiertes Volumen) und dem Kehrwert der höchsten ausgewerteten Verdünnungsstufe multipliziert.

$\text{Gew. Mittelwert} = (\sum \text{Kolonien} / \text{Verdünnungsfaktor}) \times \text{Plattenfaktor} \times \text{höchste Verdünnungsstufe}$

2.6.7. Bestimmung der CFU in der Infektionslösung I

Um im Gentamicinassay die eukaryotischen Zellen mit einer bestimmten MOI (*multiplicity of infection*; Bakterienzahl pro Zelle) infizieren zu können, wurde stets zunächst die CFU/ml bestimmt. Die Infektionslösungen von *B. cereus* und probiotischen *Lactobacillus*-Stämmen wurden direkt aus der Übernachtskultur der jeweiligen Stämme angesetzt. Die Infektionslösungen von *C. sakazakii* und *L. monocytogenes* wurden dagegen aus logarithmisch wachsenden Kulturen angesetzt. Dazu wurde bei *C. sakazakii* ein 2 % iges Inokulum aus der Übernachtskultur in frischem LB-Medium angeimpft und für 2 Stunden bei 37 °C und 250 rpm inkubiert. Bei *L. monocytogenes* wurde die Übernachtskultur 1:10 in frischem BHI-Medium verdünnt und bis OD₆₀₀ = 1,0 angezogen. Anschließend wurden die Kulturen bei 2095 g für 10 Minuten zentrifugiert, das Pellet in PBS gewaschen und in FCS-freiem RPMI-Medium resuspendiert (=Infektionslösung I). Zur CFU-Bestimmung wurde eine Verdünnungsreihe bis 10^{-6} angelegt und die Verdünnungsstufen 10^{-4} bis 10^{-6} dreifach auf Agarplatten ausplattiert. Nach der Inkubation bei 37 °C über Nacht wurden die Kolonien ausgezählt und die CFU/ml mittels des gewichteten Mittelwerts bestimmt. Insgesamt wurden pro Bakterien-Stamm aus drei unabhängigen Replikaten die CFU/ml

bestimmt, der Mittelwert gebildet und dieser zur Berechnung der MOI in den Infektionsversuchen eingesetzt.

2.7. Fluoreszenzmikroskopie

2.7.1. Lebend-Tod-Färbung

- Propidiumiodid (5 mg/ml) und Syto 9 Green Fluorescent Nucleic Acid Stain (5 mM) jeweils 1:10 in A. dest. verdünnen
- 0,5 ml/Well PBS zu den VBNC-Zellen geben und für 2 h bei 37 °C inkubieren
- durch Auf- und Abpipettieren die VBNC-Zellen lösen und in ein Eppendorfgefäß geben
- bei 8000 rpm für 10 min zentrifugieren
- Pellet in 50 µl 0,85 % iger NaCl-Lösung resuspendieren
- erneut bei 8000 rpm für 10 min zentrifugieren
- Pellet in 50 µl 0,85 % iger NaCl-Lösung resuspendieren
- aus der 1:10 Verdünnung jeweils 2 µl Propidiumiodid und 0,5 µl Sytogreen zugeben, vortexen
- 15 min lichtgeschützt bei RT inkubieren
- 5 µl vom Ansatz auf Objektträger geben und unter dem Fluoreszenzmikroskop mikroskopieren

2.7.2. DAPI-Färbung

- $2,5 \times 10^6$ CFU/ml einer *C. turicensis-gfp* ÜNK und $2,5 \times 10^7$ CFU/ml einer *Lactobacillus* spp.-ÜNK in 200 µl PBS geben, vortexen
- 2 h bei 37 °C ohne Schütteln koinkubieren
- 1/100 Vol. DAPI-Farbstoff zugeben und für 10 min bei RT inkubieren
- 5 µl auf einen Objektträger geben und unter Fluoreszenzmikroskop analysieren

IV. ERGEBNISSE

1. Physiologische und biochemische Biofilmcharakterisierung bei *Cronobacter sakazakii*

Die Fähigkeit, Biofilm zu bilden, trägt entscheidend zum Überleben von *C. sakazakii* sowohl in der Umwelt als auch im Wirtsorganismus bei und ist abhängig von Umweltfaktoren und der Nährstoffsituation. Biofilme sind heterogene Systeme, die zur Nährstoffanreicherung, Anheftung an Oberflächen und dem Schutz vor äußeren Umwelteinflüssen, wie z.B. Austrocknung, dienen und somit die Tenazität von *C. sakazakii* in der Umwelt erhöhen. Um den Einfluss verschiedener Umweltfaktoren und Nährstoffangebote auf die Biofilmbildung von *C. sakazakii* zu untersuchen und zu überprüfen, ob eine Korrelation zwischen der Biofilmbildung und der Virulenz besteht, wurde ein standardisiertes Modell zu Biofilmbildung etabliert und die Virulenz der Biofilmbildenden Bakterien im Zellkulturmodell untersucht. Dazu wurden 20 Stämme aus der Stammsammlung des Lehrstuhls für Hygiene und Technologie der Milch der Ludwig-Maximilians-Universität München ausgewählt, auf ihre Fähigkeit, Biofilm zu produzieren, untersucht und biochemisch analysiert. Das Stamm-Set besteht aus 11 Umweltisolaten, die aus Säuglingsnahrung isoliert wurden, 8 klinischen Isolaten (z.B. Spinalflüssigkeit, Kehlkopf) und dem *C. sakazakii*-Stamm 21122, dessen Herkunft unbekannt ist, der jedoch laut Literatur in der Lage ist, eine Kapsel zu bilden (Iversen *et al.*, 2007).

1.1. Wachstum und Biofilm-Phänotyp auf verschiedenen festen Nährmedien

Um zu untersuchen, ob Unterschiede in der Biofilmbildung zwischen den *C. sakazakii*-Stämmen und hinsichtlich der Zusammensetzung von Medien bestehen, wurden die 20 *C. sakazakii*-Stämme auf festem Minimal- (MM), LB- und Milch-Medium ausgestrichen und bei 37 °C bzw. Raumtemperatur für 24 bis 72 h inkubiert und anschließend makroskopisch die Biofilmbildung beurteilt. Die Einteilung in stark biofilmbildenden und schwach biofilmbildenden Phänotyp wurde optisch anhand der folgenden Morphologiekriterien vorgenommen: Glanz, Kontur und Oberflächenstruktur. Alle *C. sakazakii*-Stämme zeigen bei 37 °C sowie bei Raumtemperatur auf den drei Nährmedien, die sich hinsichtlich ihrer Nährstoffzusammensetzung stark unterscheiden, innerhalb von 24 h ein gutes Wachstum. Während Milch-Agar, der aus trinkfertiger Säuglingsanfangsmilch hergestellt wurde, ein breites Spektrum an Kohlenhydraten, Fetten, Eiweißen, Vitaminen und Mineralstoffen enthält, ist Minimalmedium ein sehr

nährstoffarmes Medium, da es außer Maltose (0,4 %) keine weiteren Kohlenhydratquellen enthält. LB-Medium weist im Vergleich zu den beiden anderen Medien einen mittleren Nährstoffgehalt auf und wird insbesondere zur Kultivierung von *Enterobacteriaceae* verwendet. Das Ergebnis der Kultivierung der *C. sakazakii*-Stämme auf verschiedenen Nährmedien ist in Abb. 3 dargestellt.

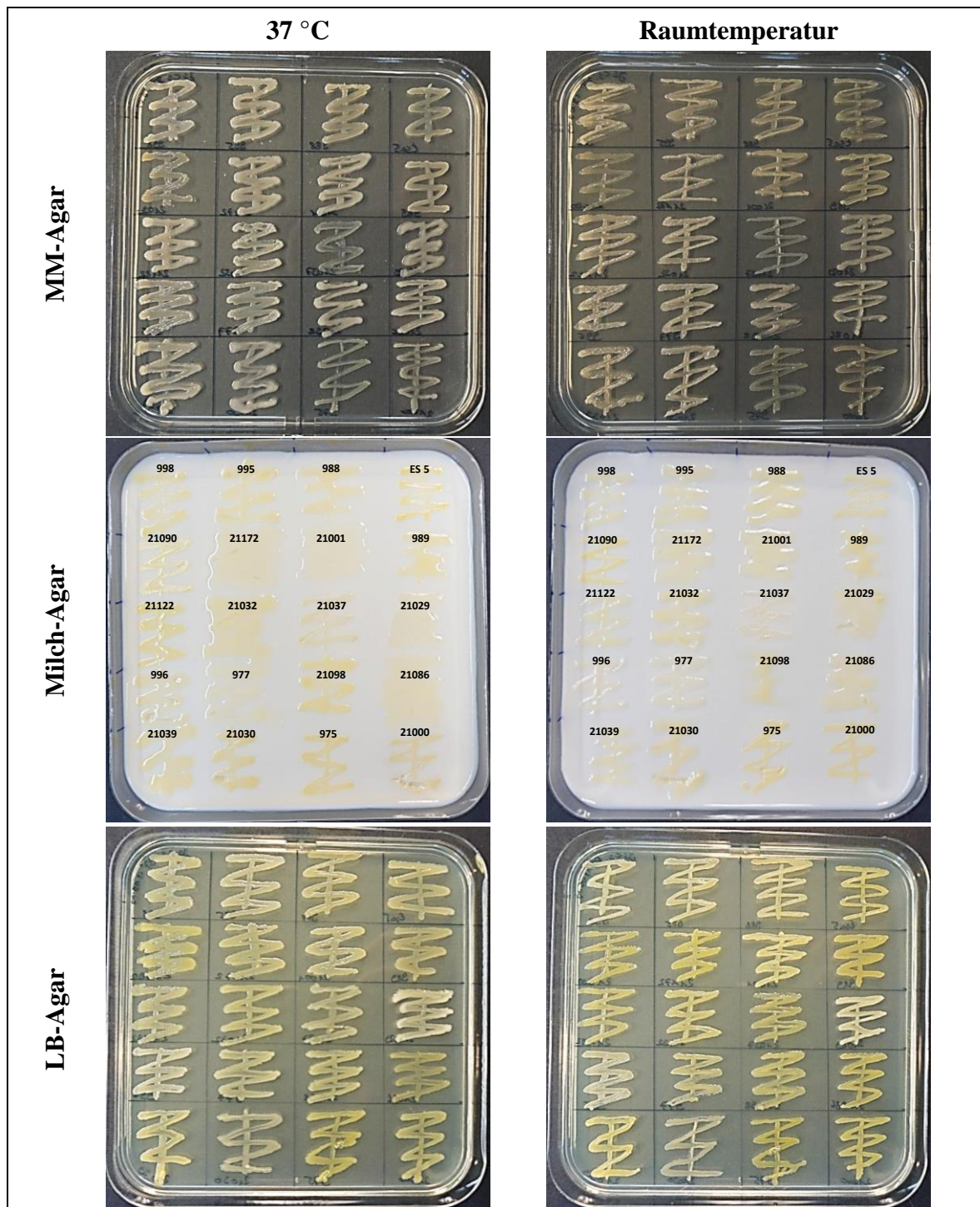


Abb. 3: Biofilmmorphologie von *C. sakazakii*-Stämmen auf MM-Agar, Milch-Agar und LB-Agar nach 24 h bei 37 °C und bei Raumtemperatur.

Die stammspezifische Ausprägung der Biofilmbildung zeigt deutliche Unterschiede

zwischen den einzelnen Nährmedien. Auf Milch-Agar ist die Biofilmbildung am stärksten ausgeprägt. Sowohl bei 37 °C als auch bei Raumtemperatur zeigt der Großteil der Stämme bereits nach 24 h einen stark glänzenden, massiv schleimbildenden Phänotyp, bei dem der Ausstrich zum Teil ineinander verläuft, sodass sich das Tannenbaummuster nicht mehr erkennen lässt. Nur wenige Stämme zeigen eine raue, trockene Oberfläche. Die Biofilmbildung auf MM-Agar ist deutlich schwächer als auf Milch-Agar, dennoch ist bei dem Großteil der Stämme eine glänzende, schleimige Morphologie zu erkennen. Auf LB-Agar hingegen ist die Biofilmbildung trotz des großen Nährstoffangebots makroskopisch am schwächsten. Im Vergleich zum Wachstum bei 37 °C weisen die bei Raumtemperatur inkubierten *C. sakazakii*-Stämme nach 24 h auf allen Nährmedien eine geringere Biofilmbildung auf. Nach weiteren 24 h der Inkubation ist jedoch fast kein phänotypischer Unterschied mehr zu der Kultivierung der bei 37 °C inkubierten *C. sakazakii*-Stämme zu erkennen. Diese zeitliche Verzögerung lässt darauf schließen, dass die Biofilmbildung ein zeitlich strukturierter Prozess ist, der temperaturabhängig ist. Da Biofilme entscheidend zum Überleben der Bakterien sowohl in der Umwelt (u.a. Schutz vor Austrocknung) als auch im Wirtsorganismus beitragen, wurde zusätzlich untersucht, ob eine Korrelation zwischen der Herkunft der *C. sakazakii*-Stämme und ihrer Morphologie der Biofilmbildung besteht. Der Großteil der Umwelt-Isolate (91 %) produziert auf Milch-Agar massiv Biofilm. Im Gegensatz dazu ist der Anteil an stark biofilmbildenden (50%) zu schwach biofilmbildenden (50 %) klinischen Isolaten auf Milch-Agar ausgewogen. Ein ähnliches Bild zeigt sich bei der Kultivierung auf MM-Agar: Der überwiegende Anteil der Umwelt-Isolate (82 %) produziert viel Biofilm, wohingegen nur die Hälfte der klinischen Isolate diese Eigenschaft aufweist (Abb. 4). Auf LB-Agar sind mit 55 % deutlich weniger Umwelt-Isolate in der Lage, Biofilm in großer Menge zu produzieren. Der Anteil an stark biofilmbildenden klinischen Isolaten ist mit 75 % höher als bei den anderen Nährmedien.

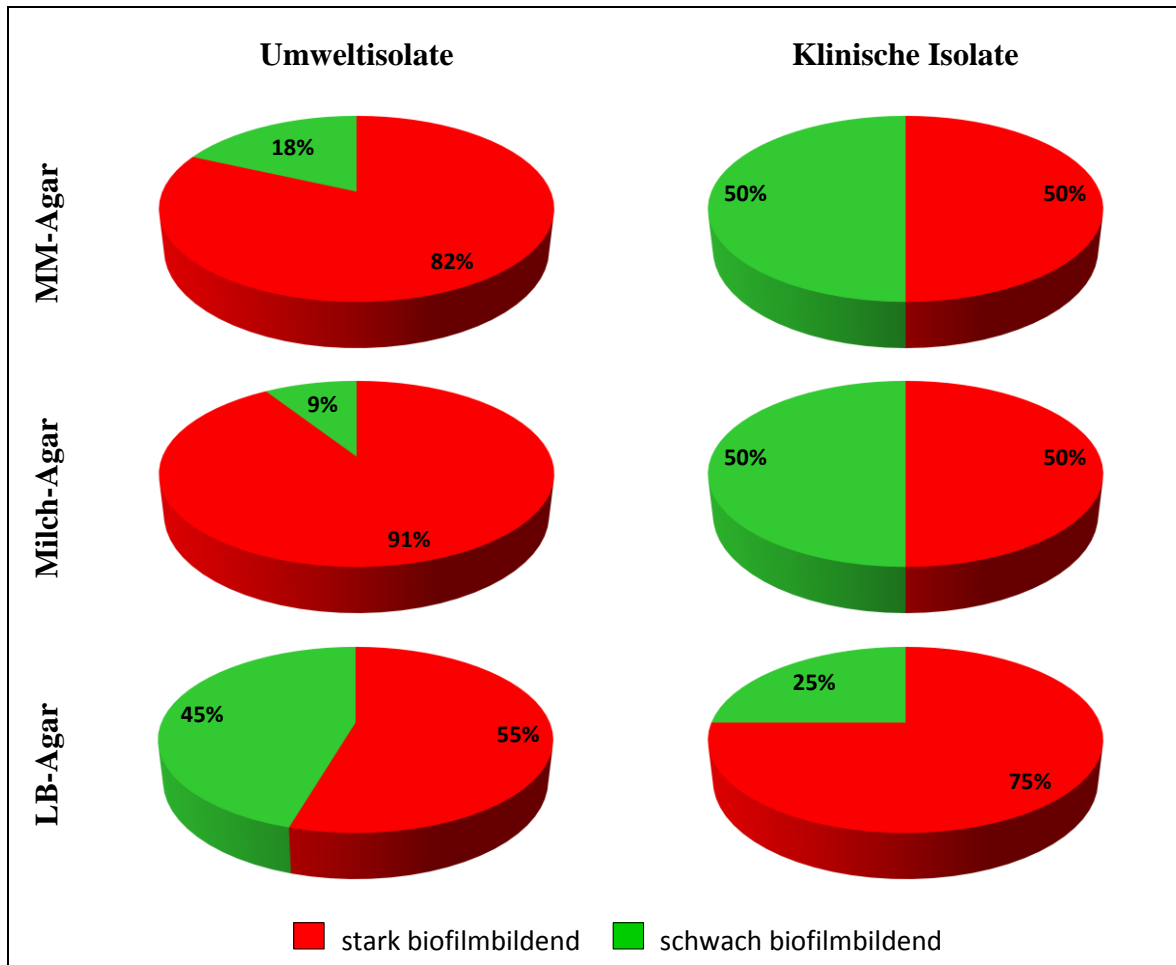


Abb. 4: Prozentuale Darstellung der biofilmproduzierenden *C. sakazakii*-Stämme bei Umweltisolaten und klinischen Isolaten auf verschiedenen Medien.

1.2. Wachstum und Biofilm-Phänotyp in Flüssigmedium

Basierend auf der phänotypischen Auswertung der Biofilmbildung auf Festmedium, wurden drei *C. sakazakii*-Stämme ausgewählt, die sich in ihrer Fähigkeit, auf Festmedium Biofilm zu produzieren, unterscheiden: *C. sakazakii* ES 5, der eine geringe Schleimbildung aufweist, *C. sakazakii* 21029, der massiv Biofilm produziert und *C. sakazakii* 21122 (Kapsel bildender Stamm), der eine intermediäre Stellung bezüglich der produzierten Biofilmmenge annimmt. Darüber hinaus wurden die von Dr. K. Schauer konstruierten *wzx*-Mutanten von *C. sakazakii* ES 5 bzw. *C. sakazakii* 21029 verwendet, bei denen das *wzx*-Gen, welches für das Enzym Flippase kodiert, fehlt. Die Flippase ermöglicht den Transport von Zuckereinheiten in den periplasmatischen Raum. Durch die Deletion des *wzx*-Gens wird dieser Transportmechanismus, der bei der LPS-Synthese und EPS-Biosynthese eine entscheidende Rolle spielt, unterbrochen. EPS sind ein Hauptbestandteil der Biofilmmatrix und können sowohl zellgebunden oder extrazellulär vorliegen. Der Einfluss von EPS bei der Biofilmbildung soll mit Hilfe dieser Mutanten im Vergleich zum entsprechenden Wildtyp analysiert werden.

Um zu überprüfen, ob die Deletion Auswirkungen auf das Wachstumsverhalten der *wzx*-Mutanten hat, wurden die Mutanten im Vergleich zum entsprechenden Wildtyp unter optimalen Wachstumsbedingungen in LB-Medium bei 37 °C und 250 rpm im Schüttelinkubator inkubiert. Dazu wurden die Kolben à 50 ml LB-Medium mit einer optischen Dichte von $OD_{600}=0,01$ inokuliert und in regelmäßigen Abständen über einen Zeitraum von neun Stunden photometrisch gemessen (Abb. 5). Als Kontrolle diente steriles LB-Medium. Die Wachstumsanalyse ergibt keinen Unterschied zwischen den *wzx*-Mutanten und den Wildtyp-Stämmen von *C. sakazakii* ES 5 und *C. sakazakii* 21029. Somit hat die Deletion keinen Einfluss auf das allgemeine Wachstum der Stämme unter optimalen Wachstumsbedingungen. Außerdem ist das deletierte *wzx*-Gen nicht an dem übrigen Zuckermetabolismus beteiligt, sondern betrifft nur die LPS-/EPS-Biosynthese.

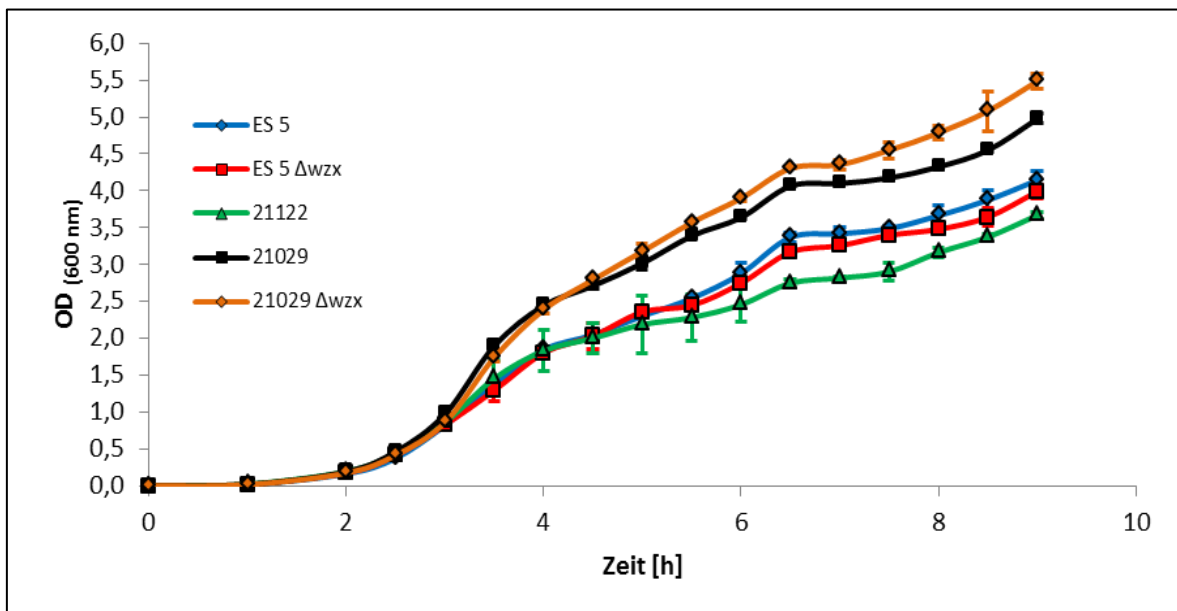


Abb. 5: Wachstum von *C. sakazakii*-Stämmen ES 5, 21122, 21029 und ihrer *wzx*-Mutanten bei 37 °C in LB (Mittelwerte stammen aus zwei Replikaten pro Stamm).

Um zu untersuchen, ob Unterschiede in der Biofilmbildung zwischen Flüssig- und Festmedium bestehen, wurden die *C. sakazakii*-Stämme ES 5 und 21029 sowie ihre *wzx*-Mutanten als auch *C. sakazakii* 21122, in MM kultiviert, welches nur mit Maltose supplementiert wurde, da sich dieses Medium laut Literatur förderlich auf die Biofilmbildung auswirkt und sich gut für die optische Bewertung des Biofilmphänotyps eignet. Die Stämme wurden für 48 h bei Raumtemperatur auf dem Taumelschüttler inkubiert und anschließend der Phänotyp bestimmt.

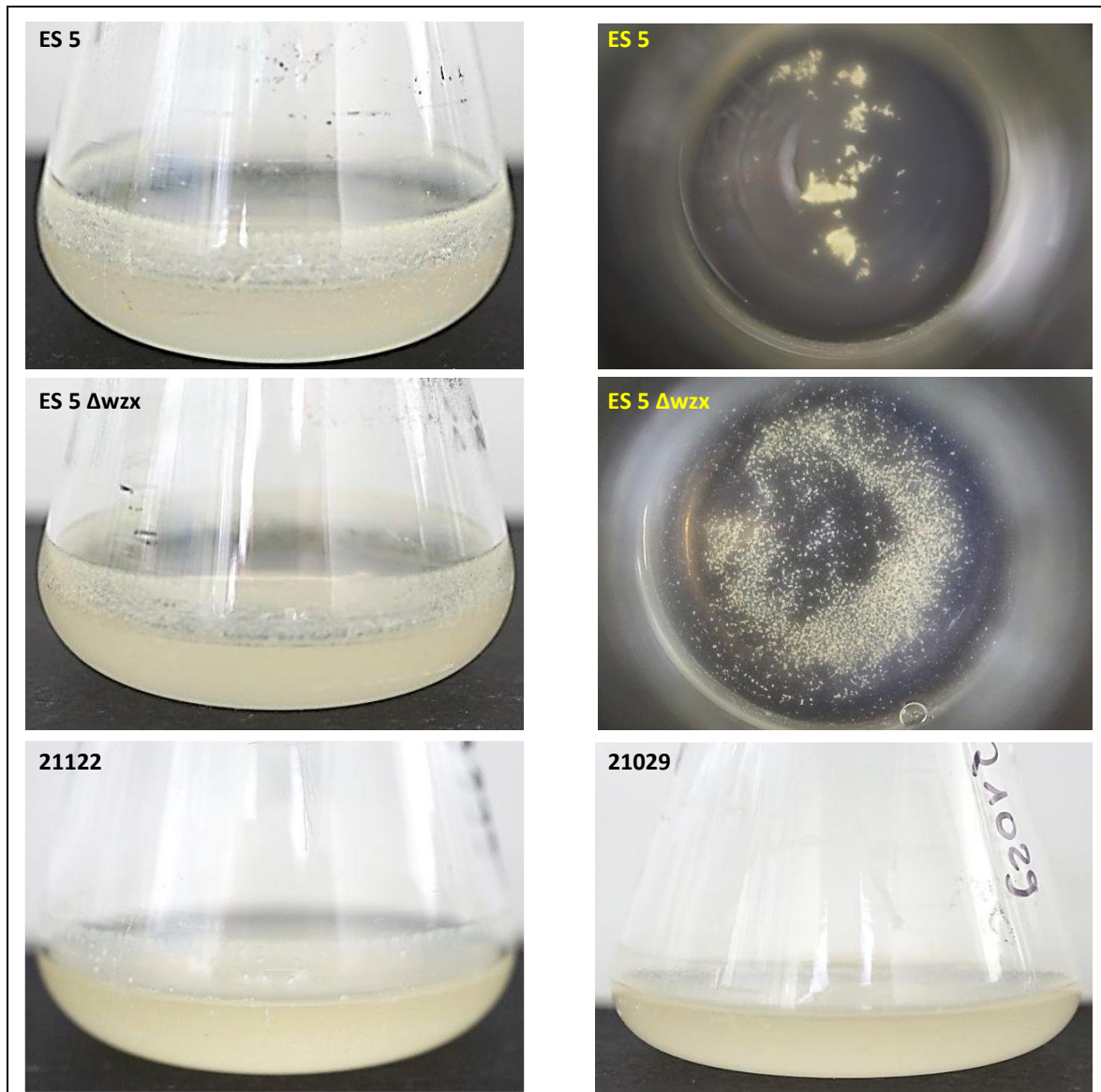


Abb. 6: Biofilmbildung von *C. sakazakii*-Stämmen in MM nach 48 h bei Raumtemperatur.

In der Abb. 6 ist zu erkennen, dass die drei ausgewählten *C. sakazakii*-Stämme und die *wzx*-Mutanten nach 48 h Inkubation in Minimalmedium ein gutes Wachstum zeigen und begonnen haben, Biofilm zu produzieren. In Abhängigkeit vom jeweiligen *C. sakazakii*-Stamm unterscheidet sich die Biofilmbildung deutlich: Die starke Biofilmbildung von *C. sakazakii* ES 5 und seiner *wzx*-Mutante wird durch Aggregat- bzw. Flockenbildung im Medium deutlich. Zusätzlich ist auch bei *C. sakazakii* 21122 eine deutliche Anhaftung des Biofilms an der Glasoberfläche des Kolbens festzustellen, welche bei *C. sakazakii* 21029 und seiner *wzx*-Mutante optisch nur sehr schwach zu erkennen ist. Diese Oberflächen assoziierte Form der Biofilmbildung entsteht durch die Anhaftung von planktonischen Zellen an die Glasoberfläche, auf der es zur verstärkten Produktion von extrazellulärer Matrix und schließlich zur Reifung des Biofilms kommt. Ein Teil des Biofilms löst sich von der Oberfläche ab und bildet die nicht Oberflächen assoziierten Aggregate, die sich

stammabhängig phänotypisch deutlich voneinander unterscheiden. Während die Aggregate von *C. sakazakii* ES 5 größer sind und sich zu noch größeren Aggregat-Komplexen zusammenlagern, sind die Aggregate der *wzx*-Mutante deutlich kleiner und liegen flockenartig vor. Vergleicht man den Biofilmpheotyp der ausgewählten Stämme auf Festmedium mit dem in Flüssigmedium, so ergibt sich dabei ein inverses Bild: Der *C. sakazakii*-Stamm ES 5, der auf allen drei Festmedien zuvor wenig Biofilm produzierte, zeigt in flüssigem Medium die stärkste Biofilmbildung, gefolgt von *C. sakazakii* 21122. Der *C. sakazakii*-Stamm 21029 mit der phänotypisch stärksten Biofilmbildung auf Festmedium ist in Minimalmedium am schwächsten biofilmbildend.

1.3. Nachweis der Zellulose-Biosynthese auf Kongo-Rot-Agar

Zellulose ist ein wichtiger Bestandteil der extrazellulären Biofilmmatrix und wird stammabhängig gebildet. Um die fünf *C. sakazakii*-Stämme hinsichtlich ihrer Zellulose-Produktion näher zu charakterisieren, wurden sie auf Kongo-Rot-Agar (CRA) bei Raumtemperatur für drei Tage inkubiert und der Phänotyp bestimmt. Dabei kann anhand der Farbstoffabsorption durch die Bakterien und ihrer Koloniemorphologie Rückschlüsse auf die Zellulosebildung gezogen werden.

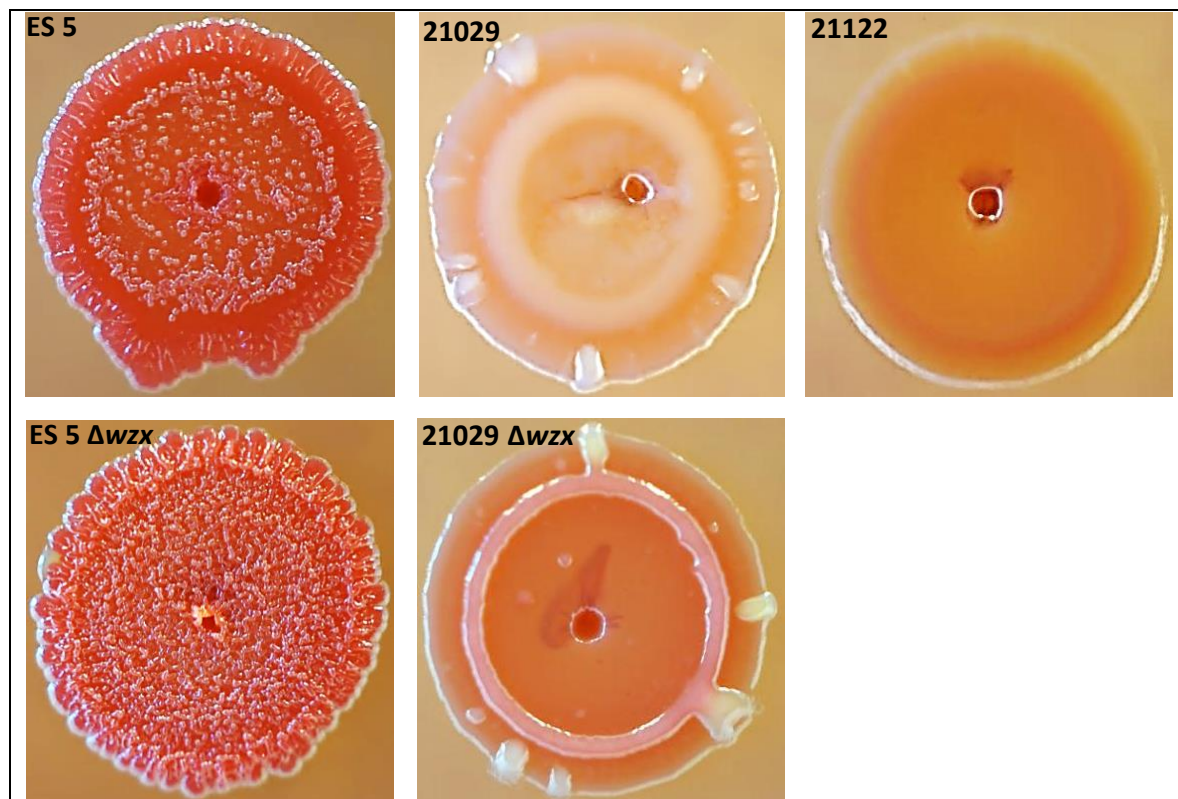


Abb. 7: Koloniemorphologie von *C. sakazakii*-Stämmen auf Kongo-Rot-Agar nach 3 d Inkubation bei Raumtemperatur.

C. sakazakii ES 5 und seine *wzx*-Mutante zeigen eine rote, trockene und raue

Koloniemorphologie. Die Koloniemorphologie von *C. sakazakii* 21029, seiner *wzx*-Mutante und des Kapsel bildenden *C. sakazakii*-Stamms 21122 ist deutlich weniger farbtensiv und hat eine glänzende Oberfläche. Die Differenzierung der Koloniefarbe in braun (*C. sakazakii* 21122), rosa (*C. sakazakii* 21029) und leicht rot (*C. sakazakii* 21029 Δwzx) ist auf die unterschiedlich starke Schleimbildung zurückzuführen. Aufgrund der Deletion des *wzx*-Gens, ist die Produktion von EPS bei der Mutante von *C. sakazakii* 21029 vermindert, sodass infolge der reduzierten Schleimbildung die rote Farbe deutlicher zu erkennen ist (Abb. 7). Basierend auf der phänotypischen Untersuchung der Koloniemorphologie können die fünf Stämme somit als Zellulose produzierend charakterisiert werden.

Zur Bestätigung der Biosynthesefähigkeit von Zellulose wurden alle Stämme mittels PCR auf das Vorhandensein des Zellulose-Synthase-Operons überprüft, bestehend aus den Genen *bcsA*, *bcsB* und *bcsC*. Diese kodieren für Proteine, die eine essentielle Rolle bei der Synthese von Zellulose spielen: Das Gen *bcsA* kodiert dabei für die Zellulose-Synthase und *bcsB* für das c-di-GMP-Bindeprotein (Ross *et al.*, 1991). Dabei konnte bei allen drei *C. sakazakii* Wildtyp-Stämmen ein 186 bp großes Fragment für *bcsA*, ein 388 bp großes Fragment für *bcsB* und ein 526 bp großes PCR-Produkt für *bcsC* nachgewiesen werden (Abb. 8). Aufgrund des Nachweises aller für die Zellulose-Synthese relevanten Gene lässt sich schließen, dass auf der Gen-Ebene alle fünf *C. sakazakii*-Stämme in der Lage sind, Zellulose zu synthetisieren. Das Ergebnis der Zellulose-Untersuchung auf molekulargenetischer Ebene korreliert somit mit dem Ergebnis der phänotypischen Analyse der Zellulosebiosynthesefähigkeit.

	<i>bcs A</i>	<i>bcs B</i>	<i>bcs C</i>
ES 5	+	+	+
21122	+	+	+
21029	+	+	+

Abb. 8: Nachweis der Zellulose-Biosynthesegene aus dem *bcs* ABC-Operon.

1.4. Quantitative Bestimmung der Biofilmkomponenten

Biofilme bestehen zu einem Großteil aus einer hydratisierten Matrix, die von den Mikroorganismen selbst gebildet wird und sich aus einem großen Spektrum an polymeren Substanzen, Proteinen, Nucleinsäuren und Lipiden zusammensetzt. In dieser Arbeit wurden die fünf *C. sakazakii*-Stämme hinsichtlich ihrer Biofilmmatrixzusammensetzung biochemisch analysiert und die Hauptbestandteile der Biofilmmatrix quantifiziert.

1.4.1. Vegetative Zellen

Der Anteil an Bakterienzellen im Biofilm ist mit 10 % der Trockenmasse relativ gering (Flemming *et al.*, 2010). Dennoch sind sie durch die Sezernierung einer Vielzahl von Substanzen und Stoffwechselprodukten maßgeblich an der Bildung der Biofilmmatrix beteiligt. Um die Zahl der vegetativen Zellen in der schleimartigen Biofilmmatrix der drei ausgewählten *C. sakazakii*-Stämme und ihrer *wzx*-Mutanten zu untersuchen, wurden die Stämme auf quadratische Milch-Agarplatten ausplattiert und 48 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien mit PBS von der Platte abgespült und die CFU bestimmt (Abb. 9).

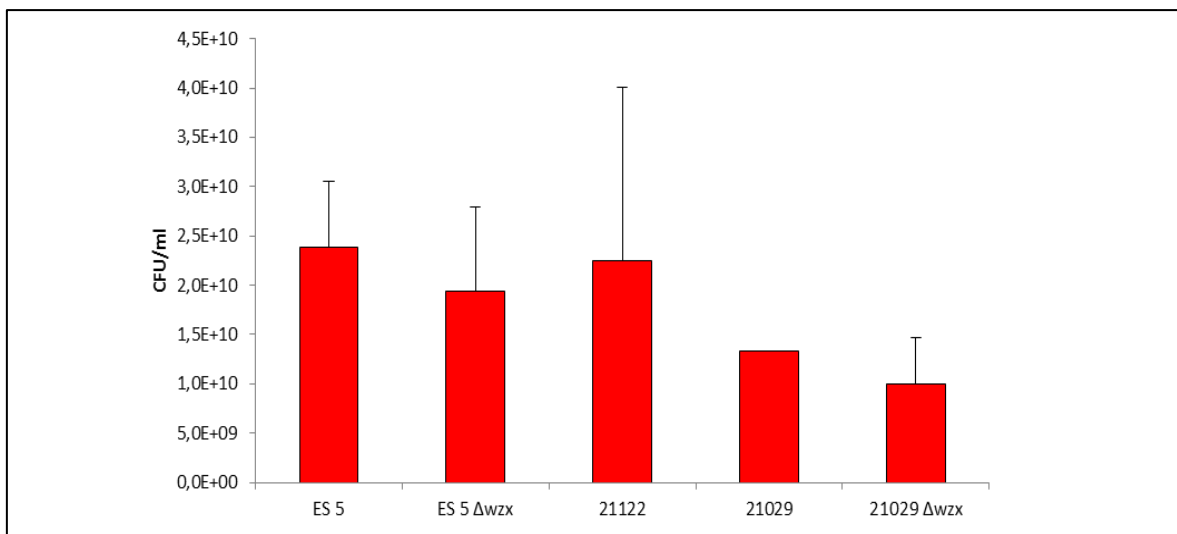


Abb. 9: Bakterientiter in der Biofilmmatrix auf Milch-Agar nach 48 h bei Raumtemperatur.

Den höchsten Bakterientiter weist der *C. sakazakii*-Stamm ES 5 mit $2,38 \times 10^{10}$ CFU/ml und der Kapsel bildende *C. sakazakii*-Stamm 21122 mit $2,25 \times 10^{10}$ CFU/ml auf. Obwohl *C. sakazakii* 21029 bei der phänotypischen Untersuchung auf dem Festmedium die stärkste Biofilmbildung erkennen lässt, ist der Anteil an vegetativen Zellen in der Biofilmmatrix im Vergleich zu den anderen Stämmen am geringsten. Der Bakterientiter der beiden *wzx*-Mutanten ist im Vergleich zum jeweiligen Wildtyp ebenfalls etwas niedriger (Abb. 9).

1.4.2. Gesamtbiofilmmatrix

Die Biofilmmatrix umgibt die Mikroorganismen und schützt sie so vor äußeren Umwelteinflüssen. Darüber hinaus ist sie für die Adhäsion an Oberflächen und den Zusammenhalt des polymeren Netzwerks verantwortlich und vermittelt die mechanische Stabilität des Biofilms (Flemming and Wingender, 2010).

Um quantitative Unterschiede in der Bildung der Biofilmmatrix detektieren zu können, wurden die Stämme in MM bei Raumtemperatur für 48 h in einer 96-Well Platte kultiviert

und die an der Oberfläche adhären Biofilmmatrix mittels Kristall-Violett-Färbung gemessen:

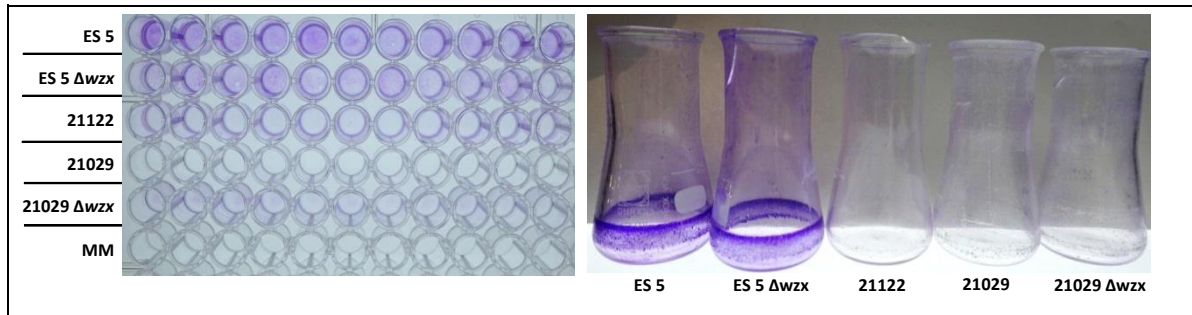


Abb. 10: Nachweis der Biofilmbildung bei *C. sakazakii*-Stämmen mittels Kristallviolett-Färbung.

Die stark violett gefärbte Biofilmmatrix verdeutlicht die Adhäsion von Bakterienzellen an die abiotischen Oberflächen der Wells einer Polystyren-Mikrotiterplatte sowie der Glasoberfläche von Erlenmeyerkolben. Diese ist insbesondere bei den *C. sakazakii*-Stämmen ES 5 und ES 5 Δwzx am stärksten ausgeprägt (Abb. 10). Da Biofilmbildung insbesondere in der Umwelt eine wichtige Schutzfunktion darstellt, wurden die 20 *C. sakazakii*-Stämme entsprechend ihrer Herkunft in Umweltisolate und klinische Isolate eingeteilt. Dadurch sollte eine mögliche Korrelation zwischen der Herkunft der Stämme und der Biofilmbildung untersucht werden. Das Ergebnis der photometrischen Messung der Biofilmbildung nach Kristall-Violett-Färbung ist in Abb. 11 dargestellt.

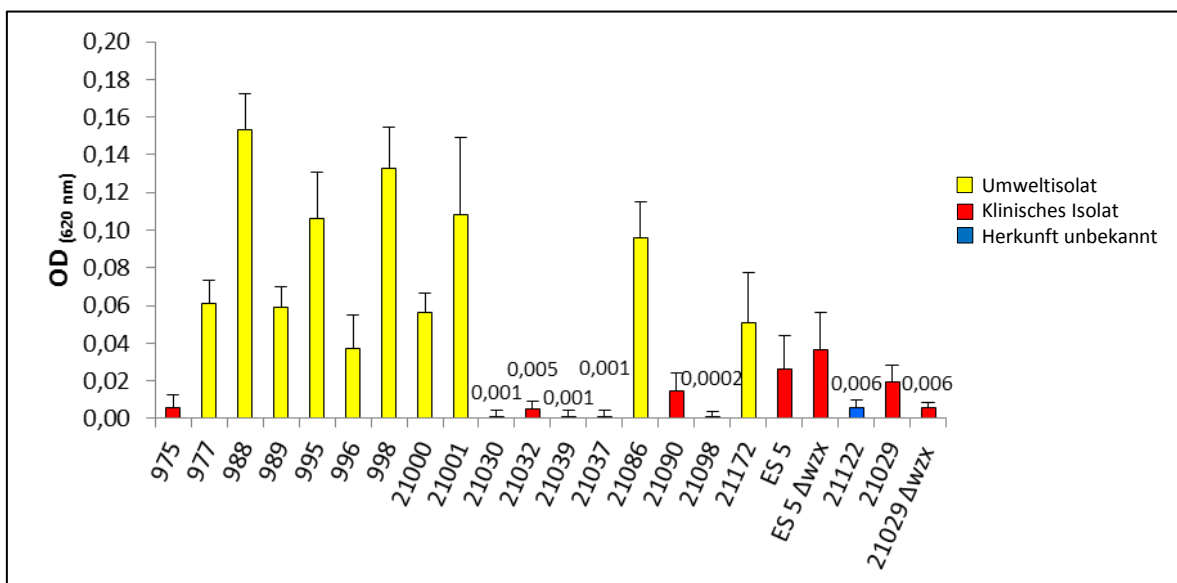


Abb. 11: Biofilmbildung bei den Umwelt- und klinischen Isolaten von *C. sakazakii*-Stämmen.

Die Auswertung ergibt bei Umweltisolaten Extinktionswerte zwischen 0,038 und 0,153, wohingegen die Werte der klinischen Isolate mit 0,001 bis maximal 0,037 deutlich niedriger sind. Zur weiteren Auswertung der gewonnenen Daten wurden die Stämme in drei Gruppen eingeteilt (Abb. 12): Stark biofilmbildend bei einer Extinktion von über

0,066, schwach biofilmbildend bei einer Extinktion unter 0,013 und moderat biofilmbildend bei einer Extinktion zwischen 0,013 und 0,066. Wie die Abb. 12 zeigt, ist bei über der Hälfte der klinischen Isolate eine schwache Biofilmbildung an abiotischen Oberflächen (Polystyren, Glas) festzustellen. Nur bei 37 % der klinischen Isolate konnte eine moderate Anhaftung beobachtet werden. Bei den Umweltisolaten ist dagegen die große Mehrheit der *C. sakazakii*-Stämme (91 %) stark bis moderat biofilmbildend.

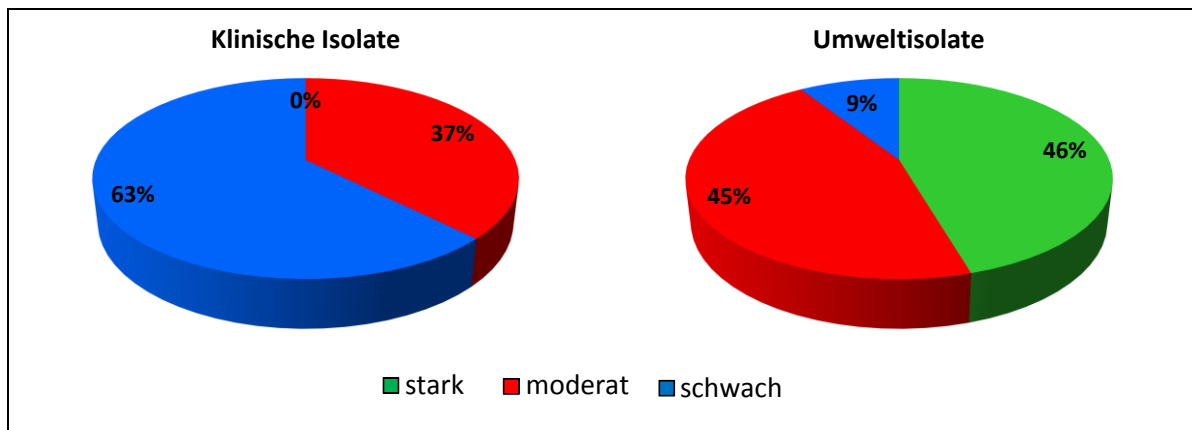


Abb. 12: Gruppierung der *C. sakazakii*-Stämme nach ihrer Herkunft und an Oberflächen produzierter Biofilmmenge.

1.4.3. Protein- und eDNA-Gehalt

Die Kristall-Violett-Färbung ist eine Methode zur Quantifizierung des Biofilms, da die Messung auf der Anfärbung der gesamten Biofilmmatrix basiert, welche aus vegetativen Zellen, Lipiden, Proteinen, extrazellulärer DNA (eDNA) und zellgebundenen sowie freien Exopolysacchariden besteht (Flemming and Wingender, 2010). Aus diesem Grund wurde zur Proteinbestimmung in der Biofilmmatrix dem Medium vor der Kristall-Violett-Färbung das Enzym Proteinase K zugegeben, welches die Peptidbindungen hydrolysiert und auf diese Weise die Struktur der Proteine nachhaltig zerstört. Parallel dazu wurde der Ansatz ohne Enzymzugabe durchgeführt, um Rückschlüsse auf den tatsächlichen Proteingehalt ziehen zu können. Zur Bestimmung der eDNA in der Biofilmmatrix wurde ein Ansatz mit dem Enzym DNase I durchgeführt, welches eDNA durch Hydrolyse der Esterbindung zwischen der 5'-Phosphatgruppe und der Hydroxylgruppe zweier Nukleotide spaltet. Die DNase-Zugabe ergab keinen Unterschied zu dem Ansatz ohne DNase I-Zugabe.

Die produzierte Biofilmmenge der fünf ausgewählten *C. sakazakii*-Stämme nach der Proteinase K-Behandlung ist im Vergleich mit unbehandelten Ansätzen graphisch in Abb. 13 dargestellt. Beim Kapsel produzierenden *C. sakazakii*-Stamm 21122 und dem auf Festmedium stark biofilmbildenden *C. sakazakii*-Stamm 21029 ist kein deutlicher

Unterschied feststellbar. Die mit Proteinase K behandelten Ansätze von *C. sakazakii* ES 5 und seiner *wzx*-Mutante sowie *C. sakazakii* 21029 weisen jedoch eine deutliche Reduktion in der Biofilmbildung auf. Insgesamt ist die Biofilmproduktion nach enzymatischer Behandlung bei *C. sakazakii* ES 5 um 56,3 %, bei *C. sakazakii* ES 5 Δwzx um 35,7 % und bei *C. sakazakii* 21029 Δwzx um 72 % reduziert. Somit konnten hinsichtlich des Proteingehalts in der Biofilmmatrix deutliche Unterschiede zwischen den ausgewählten *C. sakazakii*-Stämmen nachgewiesen werden. So ergibt sich für die *C. sakazakii*-Stämme ES 5, ES 5 Δwzx und 21029 Δwzx ein großer Anteil von Proteinen in der Gesamtbiofilmmatrix, wohingegen bei *C. sakazakii* 21122 und *C. sakazakii* 21029 die Proteinmenge im Biofilm deutlich geringer ist. Darüber hinaus konnte nachgewiesen werden, dass bei allen fünf *C. sakazakii*-Stämmen eDNA keinen Einfluss auf die Biofilmbildung hat.

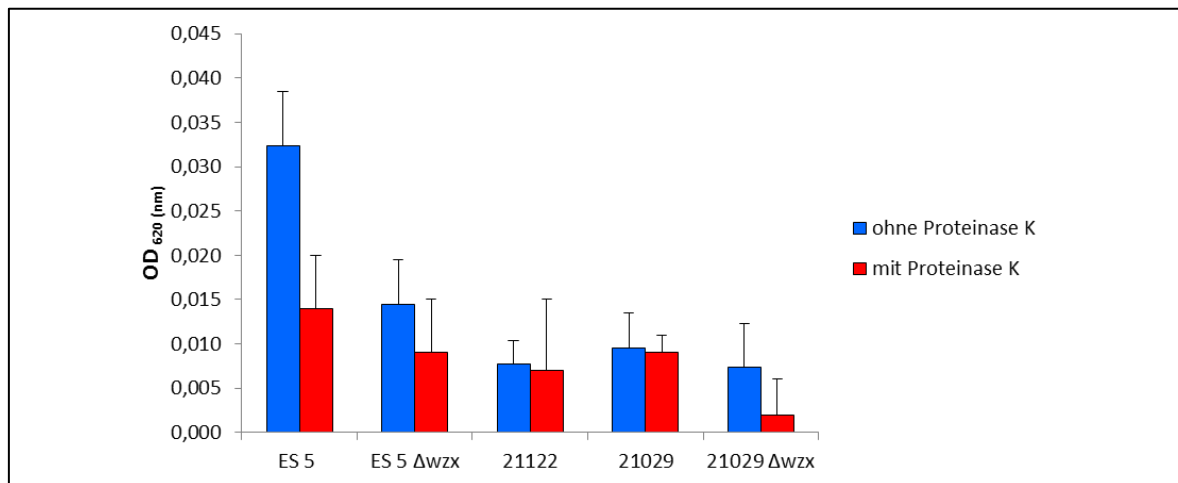


Abb. 13: Biofilmbildung bei ausgewählten *C. sakazakii*-Stämmen mit und ohne Proteinase K-Behandlung.

1.4.4. Kohlenhydratbestimmung

Den Hauptbestandteil der Biofilmmatrix stellen polymere Substanzen dar, die stammabhängig entweder in Form einer Kapsel zellgebunden vorliegen oder in den extrazellulären Raum sezerniert werden. Dabei gibt es stammspezifisch große Unterschiede sowohl in der Menge, als auch in der Zusammensetzung der Exopolysaccharide (EPS). Um die in dieser Arbeit verwendeten *C. sakazakii*-Stämme hinsichtlich ihrer EPS-Bildung zu charakterisieren, wurden alle 20 *C. sakazakii*-Stämme auf Milch-Agar für 48 h bei Raumtemperatur kultiviert. Das nährstoffreiche Medium induziert vor allem die Synthese kapsulärer Exopolysaccharide und wurde daher zur Kultivierung der Bakterien und zur Isolierung der EPS verwendet. Wie die Abb. 14 A zeigt, produziert *C. sakazakii* ES 5 im Vergleich zum Kapsel produzierenden *C. sakazakii*-

Stamm 21122 und dem auf Festmedium stark biofilmbildenden *C. sakazakii*-Stamm 21029 deutlich mehr Gesamt-EPS. Dies korreliert mit dem Ergebnis der Kristall-Violett-Färbung (Abb. 10). Obwohl der Biofilmphänotyp auf Festmedium bei *C. sakazakii* 21029 eine starke Biofilmbildung erkennen lässt, bildet dieser Stamm am wenigsten EPS. Dies ist ein Indiz dafür, dass die Biofilmmatrix von *C. sakazakii* 21029 in einer stark hydratisierten Form vorliegt. Das Ergebnis, dass die EPS-Bildung der beiden *wzx*-Mutanten deutlich niedriger als die von *C. sakazakii* ES 5 und *C. sakazakii* 21029 ist, lässt vermuten, dass das deletierte *wzx*-Gen auch am Transport von EPS-Einheiten in den periplasmatischen Raum beteiligt sein muss. Um zwischen zellgebundenen oder extrazellulären EPS zu differenzieren, wurde im nächsten Schritt eine Auftrennung der isolierten EPS vorgenommen. Wie in Abb. 14 B zu sehen ist, können alle Stämme mit Ausnahme von *C. sakazakii* ES 5 Δwzx sowohl zellgebundene als auch extrazelluläre EPS synthetisieren, jedoch ist der Anteil an zellgebundenem EPS höher als der an extrazellulären EPS. Bisher wurde die Kapselbildung bei den in dieser Arbeit untersuchten Stämmen ausschließlich für *C. sakazakii* 21122 in der Literatur beschrieben (Iversen *et al.*, 2007). Dieses Ergebnis liefert jedoch Hinweise darauf, dass auch die *C. sakazakii*-Stämme ES 5 und 21029 in der Lage sind, eine Kapsel zu bilden.

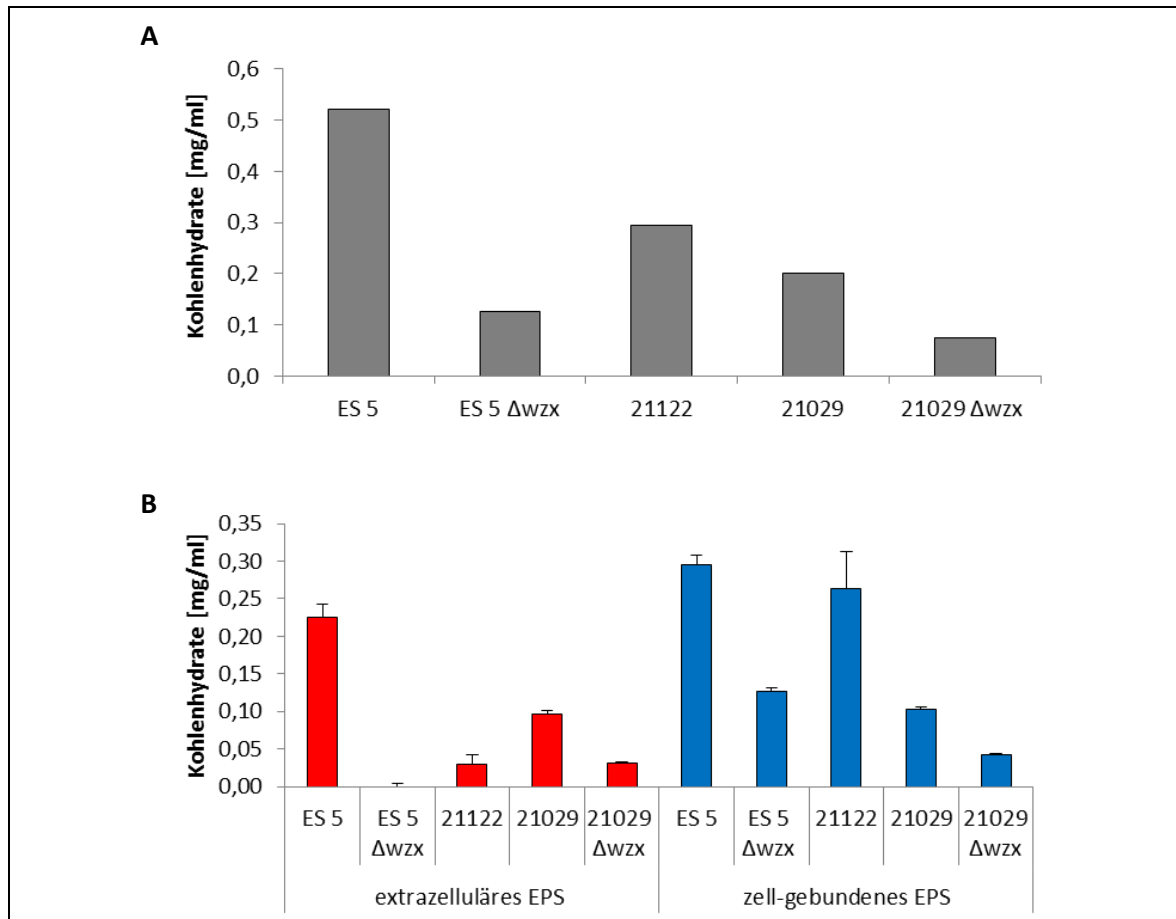


Abb. 14: Vergleich der EPS-Produktion bei ausgewählten *C. sakazakii*-Stämmen: (A) EPS-Gesamtmenge und (B) Differenzierung zwischen extrazellulären und zellgebundenen EPS.

2. Induktion und Reaktivierung von VBNC-(*viable but nonculturable*) Stadien bei *C. sakazakii*

Aufgrund seiner Anpassungsfähigkeit an nährstoffarme Bedingungen ist *C. sakazakii* in der Lage, seine metabolische Aktivität auf ein Minimum zu reduzieren und in das sogenannte VBNC-Stadium (*viable but nonculturable*) überzugehen. Um das Verhalten von VBNC-Zellen zu charakterisieren und ihre Virulenz in Wirtszellen zu untersuchen, wurde bei drei *C. sakazakii*-Stämmen und zwei *wzx*-Mutanten das VBNC-Stadium unter standardisierten Bedingungen induziert, ihre Kolonisationsfähigkeit in Caco-2-Zellen analysiert sowie die Reaktivierung des kultivierbaren Zustands *in vitro* untersucht.

2.1. Induktion des VBNC-Stadiums durch Austrocknung

Zur Austrocknung wurden die *C. sakazakii*-Stämme ES 5, 21122, 21029 und ihre *wzx*-Mutanten für 48 h in Minimalmedium bei Raumtemperatur auf dem Taumelschüttler kultiviert, anschließend die Aggregate von den planktonischen Zellen mittels differentieller Zentrifugation getrennt und die Zellzahl auf 10^7 - 10^9 CFU/ml eingestellt. Die

Bakterienlösungen wurden à 200 µl/Well in 24-Well-Platten verteilt und bis zur vollständigen Verdunstung der Flüssigkeit unter der Werkbank stehen gelassen. In regelmäßigen Abständen wurden die Bakterienzellen in BPW aufgenommen und ihre Kultivierbarkeit auf dem festen LB-Medium untersucht.

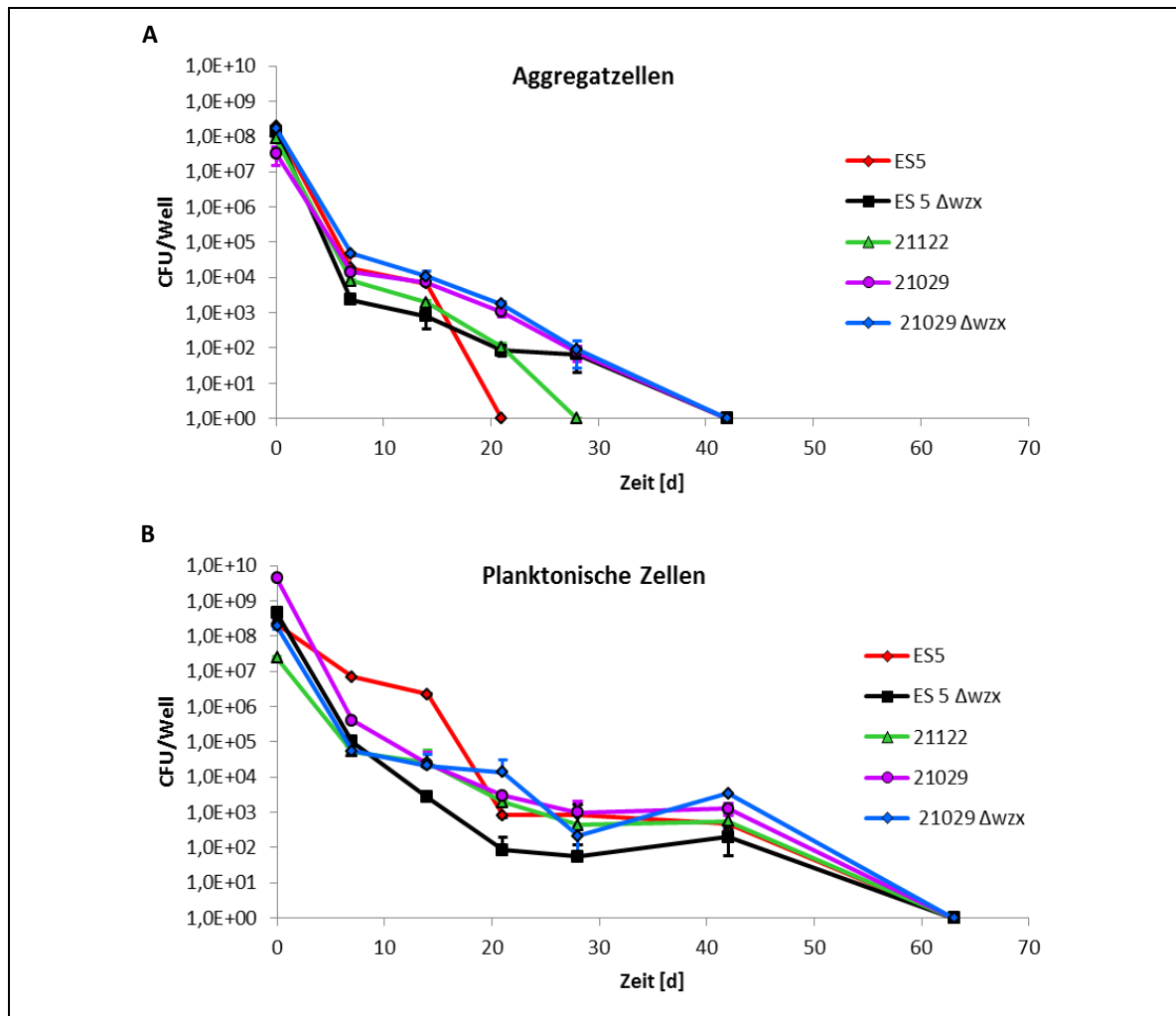


Abb. 15: Induktionsverlauf des VBNC-Stadiums durch Austrocknung bei *C. sakazakii*-Stämmen: (A) Aggregatzellen und (B) planktonische Zellen.

Die Abb. 15 A zeigt eine deutliche Abnahme der kultivierbaren Aggregatzellen innerhalb der ersten sieben Tage um mindestens drei log-Stufen. Der Bakterientiter der einzelnen Stämme weist dabei deutliche Unterschiede auf, die im Zusammenhang mit dem jeweiligen Biofilmphänotyp stehen könnten: Die Abb. 15 A zeigt, dass die CFU-Abnahme bei *C. sakazakii* 21029, der auf dem Festmedium vergleichsweise viel Biofilm produziert, mit drei log-Stufen am niedrigsten ist, wohingegen die CFU-Abnahme von *C. sakazakii* ES 5, der auf Festmedium wenig Biofilm produziert, vier log-Stufen beträgt. Auch ist die Abnahme der kultivierbaren Aggregatzellen der *wzx*-Mutanten im Vergleich zu den *C. sakazakii*-Stämmen ES 5 und 21029 mit jeweils einer log-Stufe höher (Abb. 15 A). Obwohl alle Stämme mit einer annähernd gleichen CFU/Well (10^7 - 10^8) ausgesät wurden,

ist die Dauer bis zum vollständigen Übergang in den nicht kultivierbaren Zustand sehr unterschiedlich. Die Aggregatzellen von *C. sakazakii* ES 5 und *C. sakazakii* 21122 lassen bereits nach 21 bis 28 Tagen kein Wachstum auf Festmedium mehr erkennen, wohingegen dieses Stadium bei dem stark biofilmbildenden *C. sakazakii*-Stamm 21029 und seiner *wzx*-Mutante erst nach 42 Tagen erreicht ist (Abb. 15 A). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass eine vermehrte Biofilmbildung die Bakterienzellen vor Austrocknung schützt. Die Abb. 15 B zeigt, dass die CFU-Abnahme bei den planktonischen Zellen der *C. sakazakii*-Stämme ES 5, ES 5 Δwzx und 21122 im Vergleich zu den Aggregatzellen innerhalb der ersten sieben Tage um durchschnittlich ein bis zwei log-Stufen geringer ist. Der *C. sakazakii*-Stamm 21029 und seine *wzx*-Mutante hingegen weisen eine höhere CFU-Abnahme im Vergleich zu den Aggregatzellen auf. Die Dauer bis zum vollständigen Übergang in den nicht kultivierbaren Zustand ist bei den planktonischen Zellen aller *C. sakazakii*-Stämme mit 63 Tagen deutlich länger als bei den Aggregatzellen. Die CFU-Zunahme bei den *wzx*-Mutanten der *C. sakazakii*-Stämme ES 5 und 21029 zum Zeitpunkt $t=42$ d ist auf ein Artefakt zurückzuführen, welches aufgrund leichter Abweichungen in der Zellzahl der einzelnen Wells hervorgerufen wird (Abb. 15 B).

Erfolgte nach 24 h der Inkubation bei 37 °C kein Wachstum auf dem Nährboden, wurde zur Überprüfung des VBNC-Stadiums eine Lebend-Tod-Färbung der Bakterienzellen durchgeführt.

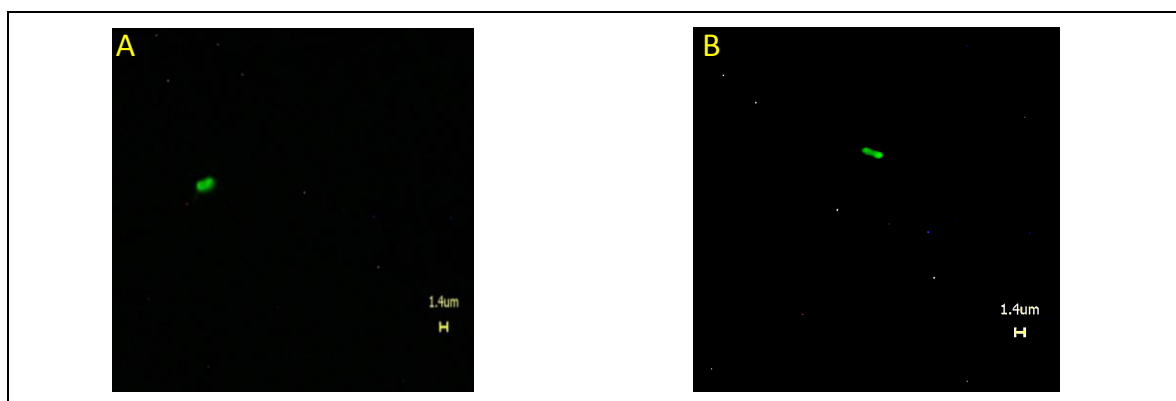


Abb. 16: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der ein Jahr alten VBNC-Zellen von *C. sakazakii* 21122 (A) Aggregatzelle und (B) planktonischer Zelle.

Die Abb. 16 zeigt exemplarisch die fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer Aggregatzelle (A) und einer planktonischen Zelle (B) von *C. sakazakii* 21122 im VBNC-Zustand nach einem Jahr Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln. Auf Standard- und Selektivnährboden war *C. sakazakii* nicht kultivierbar. Durch die Lebend-Tod-Färbung konnte die Vitalität der Zellen jedoch nachgewiesen werden.

2.2. Reaktivierung von VBNC-Zellen in modifizierten Standardmedien

Das VBNC-Stadium ist ein reversibler Vorgang, der das Überleben unter nährstoffarmen Bedingungen oder anderen Stressbedingungen ermöglicht. Umweltveränderungen, wie z.B. die Änderung des Nährstoffangebots, der Temperatur oder des Milieus, können den VBNC-Zustand terminieren und zur Reaktivierung des vegetativen Zustands führen. In dieser Arbeit wurden verschiedene Bedingungen, wie die Rekonstitution in Säuglingsnahrung oder Wirtszellkontakt, simuliert und das Verhalten der VBNC-Zellen untersucht.

Der mikrobiologische Nachweis von *Cronobacter* spp. in Lebensmitteln erfolgt nach dem horizontalen Verfahren, welches nach einer nicht selektiven Voranreicherung in BPW und Anreicherung in selektiven Medien die Identifizierung auf chromogenem Agar (CCI-Agar) sowie eine biochemische Bestätigung vorsieht (ISO 22964:2017). Laut Weber *et al.* soll der Zusatz von 8-Hydroxyquinolin und Ammonium Eisen(III)-citrat nicht nur die Voranreicherung verbessern, sondern auch die Reaktivierung geschädigter Zellen fördern (Weber *et al.*, 2009). Da der Nachweis von VBNC-Zellen in der Routinediagnostik mittels Standardnährmedien nicht möglich ist, wurde in dieser Arbeit untersucht, ob die von Weber *et al.* getesteten Zusätze auch auf die Reaktivierung der VBNC-Zellen von *C. sakazakii* einen positiven Effekt haben. Zur Untersuchung wurden der Magermilch, dem BPW und dem Minimalmedium 8-Hydroxyquinolin und Ammonium Eisen(III)-citrat hinzugefügt und die VBNC-Zellen für bis zu einem Monat in diesen Medien bei 37 °C inkubiert. In regelmäßigen Abständen wurden die Proben auf CCI-Agar ausplattiert und auf Wachstum kontrolliert. Das Ergebnis ist in Tabelle 8 dargestellt.

Tabelle 8: Reaktivierung der VBNC-Zellen in verschiedenen Medien mit Zusatz von 8-Hydroxyquinolin und Ammonium Eisen(III)-citrat.

	ES 5		ES 5 Δwzx		21122		21029		21029 Δwzx	
	Aggregate	Planktonische Zellen	Aggregate	Planktonische Zellen	Aggregate	Planktonische Zellen	Aggregate	Planktonische Zellen	Aggregate	Planktonische Zellen
Magermilch	++	++	++	++	++	–	–	–	–	–
BPW	+	+	+	+	+	–	–	–	–	–
Minimalmedium	–	–	–	–	++	–	–	–	–	–

++, Reaktivierung nach < 48 h; +, Reaktivierung nach > 48 h; –, keine Reaktivierung

Die Reaktivierung der VBNC-Zellen weist große Unterschiede zwischen den einzelnen Medien aber auch zwischen den einzelnen Stämmen und den zwei Subpopulationen auf.

Die Reaktivierung der Aggregatzellen und der planktonischen Zellen von *C. sakazakii* 21029 und seiner *wzx*-Mutante sowie der planktonischen Zellen von *C. sakazakii* 21122 ist in allen drei getesteten Medien erfolglos. Im Gegensatz dazu erfolgt die Reaktivierung des *C. sakazakii*-Stamms ES 5 und der *wzx*-Mutante in Magermilch innerhalb von 48 h und in BPW nach 48 h. In Minimalmedium wird der Übergang in den kultivierbaren Zustand lediglich bei den Aggregatzellen von *C. sakazakii* 21122 induziert.

2.3. Reaktivierung von VBNC-Zellen in trinkfertiger Säuglingsanfangsmilch

Zur Untersuchung der Reaktivierung in Säuglingsnahrung wurden die VBNC-Zellen nach viermonatiger Inkubation bei RT in 0,5 ml/Well steriler, trinkfertiger Anfangsmilch bei 37 °C aufgenommen und in regelmäßigen Abständen die CFU der Bakterienlösung bestimmt. Für die Durchführung wurde anstelle pulverförmiger Säuglingsnahrung sterile, trinkfertige Anfangsmilch eingesetzt, um den Einfluss der in PIF natürlich vorhandenen Bakterien auszuschließen. Die Abb. 17 zeigt, dass es stammabhängige Unterschiede in der Dauer des Reaktivierungsprozesses in der Anfangsmilch gibt. Die Aggregatzellen der *C. sakazakii*-Stämme 21029 und 21122 lassen sich bereits nach zwei bis vier Stunden Kultivierung in Anfangsmilch auf LB-Agar nachweisen, *C. sakazakii* ES 5 und die *wzx*-Mutanten von *C. sakazakii* 21029 benötigen die doppelte Zeit, um vom nicht kultivierbaren in den kultivierbaren Zustand überzugehen. Das Wachstum der Aggregatzellen nimmt innerhalb der ersten 14 h mit annähernd einer log-Stufe pro Stunde schwach zu. Die VBNC-Zellen von *C. sakazakii* ES 5 Δwzx konnten auch nach längerer Inkubation nicht reaktiviert werden (Abb. 17 A). Die Reaktivierung der planktonischen Zellen beginnt mit Ausnahme von *C. sakazakii* 21029 erst nach 6 h nach Zugabe der Anfangsmilch und erfolgt somit im Durchschnitt schneller als bei den Aggregatzellen (Abb. 17 B). Ab diesem Zeitpunkt nimmt das Wachstum der planktonischen Zellen bei fast allen Stämmen innerhalb von zwei Stunden um zwei bis drei log-Stufen zu. Dagegen zeigen die planktonischen Zellen von *C. sakazakii* 21029 bereits nach zwei Stunden erste Kolonien auf LB-Agar. Nach 14 h Inkubation haben alle *C. sakazakii*-Stämme mit Ausnahme der Δwzx -Mutante von 21029 den Bakterientiter 10^5 bis 10^6 CFU/ml erreicht (Abb. 17 B).

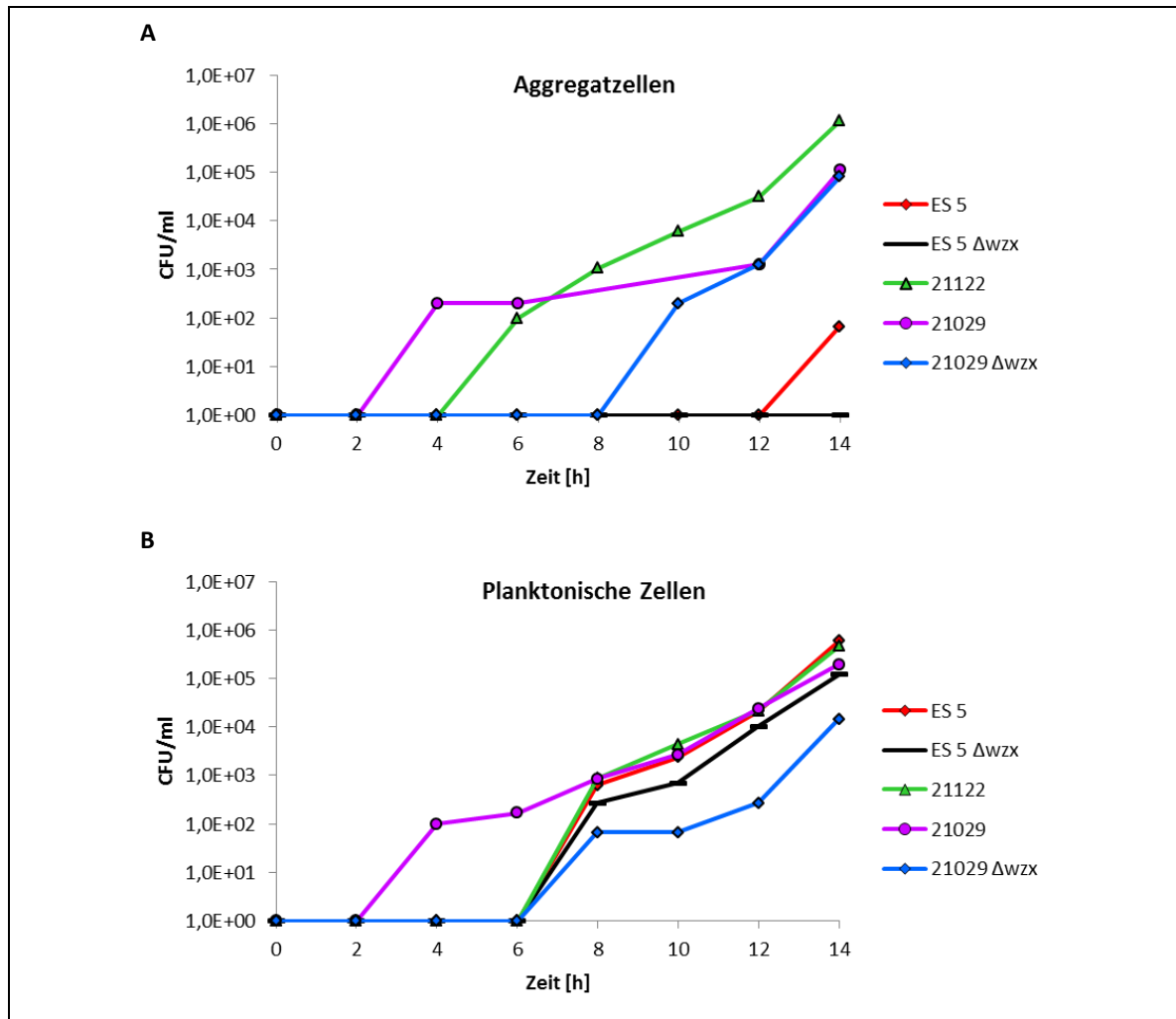


Abb. 17: Reaktivierung von *C. sakazakii*-Stämmen in trinkfertiger Säuglingsanfangsmilch: (A) Aggregatzellen und (B) planktonische Zellen.

2.4. Reaktivierung von VBNC-Zellen in Caco-2-Kulturüberstand

Die Reaktivierung der VBNC-Zellen erfolgte mit Caco-2-Kulturüberstand, um den Einfluss der Darmflora bzw. der von den Darmzellen sezernierten Substanzen auf das Verhalten von VBNC-Zellen zu untersuchen. Dazu wurde der zellfreie RPMI-Überstand von ausdifferenzierten, 16 Tage alten Caco-2-Zellen verwendet. Die VBNC-Zellen wurden anschließend bei 37 °C mit 0,5 ml/Well Überstand kultiviert und in regelmäßigen Abständen die CFU in der Bakterienlösung bestimmt. Die Abb. 18 A zeigt, dass sich die Aggregatzellen aller *C. sakazakii*-Stämme 13 h nach Zugabe des Caco-2-Kulturüberstands reaktiviert haben. Der stark biofilmbildende *C. sakazakii*-Stamm 21029 weist zu diesem Zeitpunkt mit 10^8 CFU/ml ein deutlich höheres Wachstum als die *C. sakazakii*-Stämme ES 5, ES 5 Δwzx und 21122 mit 10^2 CFU/ml auf. Der Bakterientiter von *C. sakazakii* 21029 konnte aufgrund des hohen Wachstums erst nach 15 h der Kultivierung in Caco-2-Kulturüberstand ermittelt werden und liegt zu diesem Zeitpunkt mit einer Gesamtzellzahl von 10^8 CFU/ml deutlich über der CFU der anderen *C. sakazakii*-Stämme (Abb. 18 A). Die

Wachstumszunahme von den Aggregatzellen der *C. sakazakii*-Stämme ES 5 und 21122 ist nach 23 h der Kultivierung in Caco-2-Kulturüberstand mit sechs log-Stufen deutlich zu erkennen, wohingegen die Zunahme des Bakterientiters bei der *wzx*-Mutante von *C. sakazakii* ES 5 bis zu diesem Zeitpunkt nur drei log-Stufen beträgt (Abb. 18 A). Insgesamt erreichen die Aggregatzellen von allen *C. sakazakii*-Stämmen eine Gesamtzellzahl von 10^8 bis 10^9 CFU/ml nach 30 h der Kultivierung in Caco-2-Kulturüberstand. Die planktonischen Zellen von *C. sakazakii* 21029 und seiner *wzx*-Mutante weisen im Vergleich zu den Aggregatzellen ein fast identisches Wachstumsverhalten auf (Abb. 18 B). Im Vergleich zu den Aggregatzellen der *C. sakazakii*-Stämme ES 5 und 21122 ist die Zellzahl der planktonischen Zellen nach 12 h um durchschnittlich zwei log-Stufen höher. Bei der *wzx*-Mutante von *C. sakazakii* ES 5 ist die CFU der planktonischen Zellen nach 15 h Kultivierung sogar um vier log-Stufen höher im direkten Vergleich zu den Aggregatzellen (Abb. 18 B). Nach 30 h der Kultivierung in Caco-2-Kulturüberstand erreichen die planktonischen Zellen aller *C. sakazakii*-Stämme eine Gesamtzellzahl von 10^9 CFU/ml (Abb. 18 B).

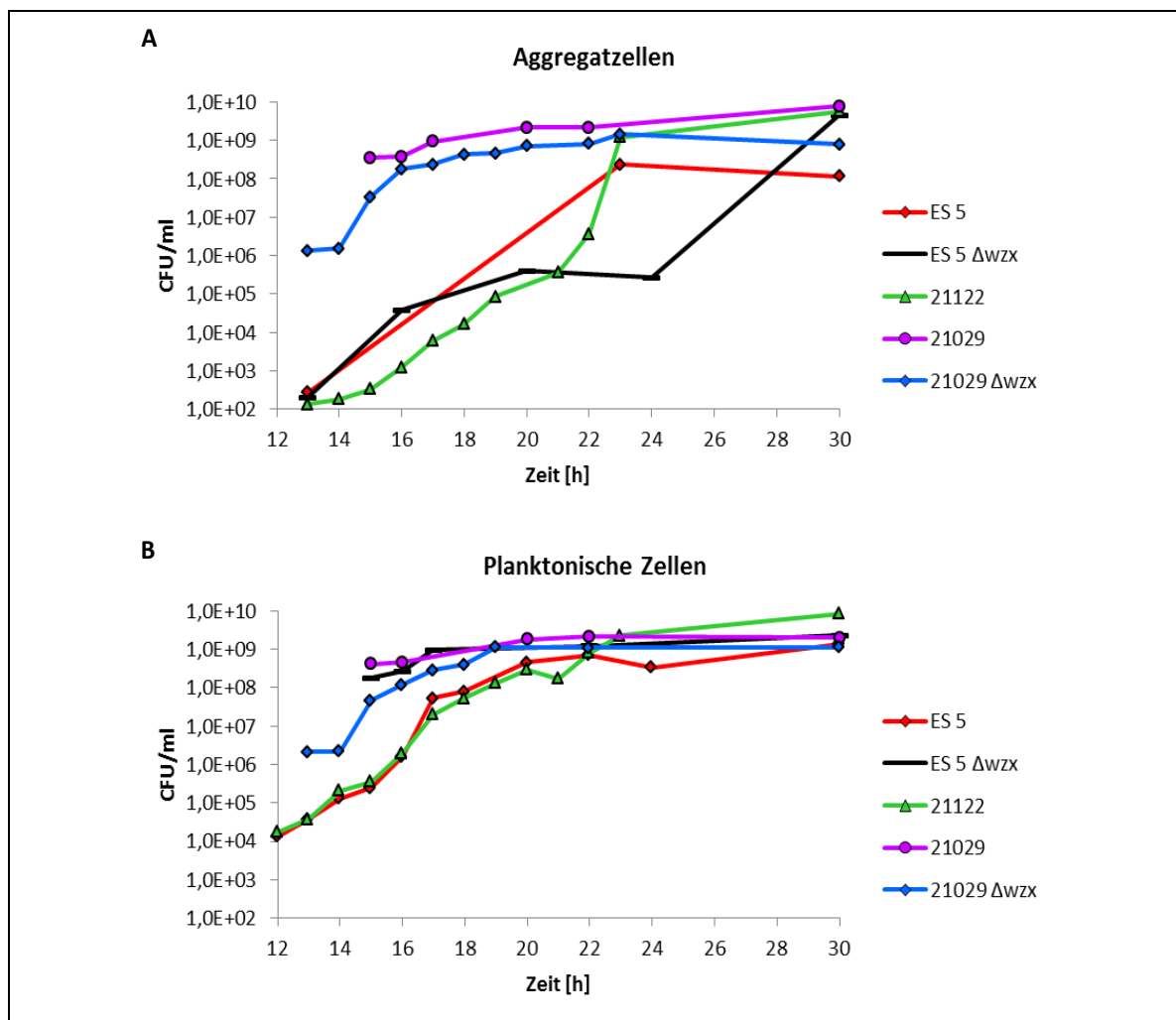


Abb. 18: Reaktivierung von *C. sakazakii*-Stämmen in Caco-2-Kulturüberstand: (A) Aggregatzellen und (B) planktonische Zellen.

2.5. Reaktivierung von VBNC-Zellen in BPW mit Zusatz von Katalase

Das Enzym Katalase, welches die Spaltung von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) zu Sauerstoff (O_2) und Wasser (H_2O) katalysiert, spielt eine wichtige Rolle bei der Reaktivierung der VBNC-Zellen (Oliver, 2010). Um zu überprüfen, ob die Zugabe von Katalase einen positiven Einfluss auch auf die Reaktivierung der VBNC-Zellen von *C. sakazakii* hat, wurde das Enzym sowohl zu Flüssig- als auch zu Festmedium zugegeben. Der Nachweis auf Festmedium erfolgte auf *Cronobacter*-Selektivnährboden (CCI), um das Wachstum anderer Bakterien zu hemmen. Auf die CCI-Agarplatten wurden 2000 U Katalase ausplattiert, bevor die in BPW aufgenommenen VBNC-Zellen ausplattiert wurden. Nach 17 h Inkubation bei 37 °C zeigten alle *C. sakazakii*-Stämme ein Wachstum. Die Reaktivierung in Flüssigmedium erfolgte über Nacht in BPW mit Zusatz von 400 U/ml Katalase. Nach der Inkubation war auch hier ein Wachstum anhand der Trübung des

Mediums zu erkennen. Zum Nachweis von *C. sakazakii* wurden die Bakterienlösungen auf *Cronobacter*-Selektivnährboden (CCI) ausplattiert. Nach Inkubation über Nacht konnte anhand der charakteristischen türkis-blauen Kolonien auf CCI-Agar das Wachstum von *C. sakazakii* bestätigt werden.

2.6. Reaktivierung von VBNC-Zellen unter *in vitro* gastrointestinalen Bedingungen

Die Infektion mit *C. sakazakii* beim Säugling erfolgt über die orale Aufnahme kontaminierter PIF, in der das Bakterium in dem VBNC-Zustand vorliegen kann. Bei ordnungsgemäßer Zubereitung liegen zwischen der Rekonstitution des Milchpulvers und seiner Verabreichung nur wenige Minuten, sodass eine Reaktivierung der evtl. vorhandenen VBNC-Zellen vor Kontakt mit dem Magen-Darm-Trakt unwahrscheinlich ist (vgl. IV.2.3). Daher wurde in dieser Arbeit die Magen-Darm-Passage von mit VBNC-Zellen kontaminierter Nahrung *in vitro* simuliert und die Reaktivierung der VBNC-Zellen analysiert. Das eingesetzte *in vitro* Modell zur Simulation des neonatalen Gastrointestinaltraktes ist schematisch in Abb. 19 dargestellt. Demnach befindet sich die Nahrung über einen Zeitraum von zwei Stunden im Magen, bevor sie in den Dünndarm gelangt. Während der Magen-Passage und der enterischen Phase 1 sind die in der Nahrung enthaltenen Bakterien über einen Zeitraum von etwa vier Stunden aufgrund der Pufferkapazität der Milch einem pH-Wert von 5 ausgesetzt. Mit Eintritt in die enterische Phase 2 erhöht sich dieser pH-Wert auf 7,1 und bleibt über die gesamte Dauer von ca. 20 h nahezu konstant.

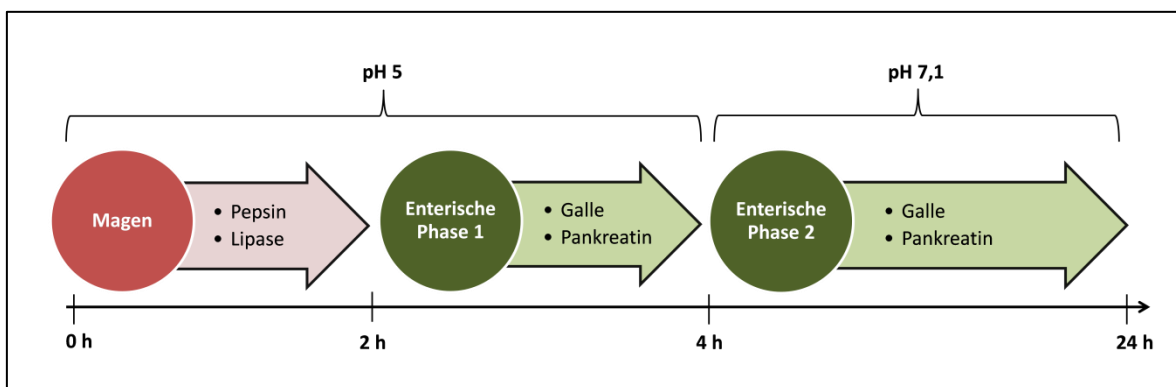


Abb. 19: Schematische Darstellung des neonatalen Verdauungsprozesses (modifiziert nach Buriti *et al.*, 2010).

Nach sechsmonatiger Kultivierung bei RT im Dunkeln wurden die VBNC-Zellen in Anfangsmilch resuspendiert und die Lösung durch die Zugabe der Enzyme Pepsin und Lipase sowie der Einstellung des pH-Wertes auf fünf an die physiologischen Magen-Darm-Bedingungen eines Neugeborenen angepasst. Nach zwei Stunden Inkubation bei

Körpertemperatur (37 °C) wurden weitere Verdauungsenzyme wie Galle und Pankreatin zugegeben. Die Erhöhung des pH-Wertes auf 7,1 erfolgte nach zwei weiteren Stunden mit 0,1 M Natriumlauge. Die Konzentration an Galle und Pankreatin wurde anschließend auf das erhöhte Gesamtvolumen angepasst, um über die gesamte Dauer des Versuchs konstante Bedingungen zu gewährleisten. Ab dem Zeitpunkt $t=18$ h wurde in regelmäßigen Abständen die CFU/ml in der Lösung gemessen. Nach 24 h konnten die VBNC-Zellen reaktiviert werden. Lediglich die VBNC-Zellen von den Aggregatzellen der *C. sakazakii*-Stämme ES 5 und 21029 Δwzx konnten über die gesamte Dauer des Versuchs nicht ihren vegetativen Zustand zurückerlangen. Die Wachstumskurven in Abb. 20 dienen der exemplarischen Darstellung der Reaktivierung aller untersuchten VBNC-Aggregat- und planktonischen Zellen der *C. sakazakii*-Stämme ES 5, ES 5 Δwzx , 21122, 21029 und 21029 Δwzx mit o.g. Ausnahme.

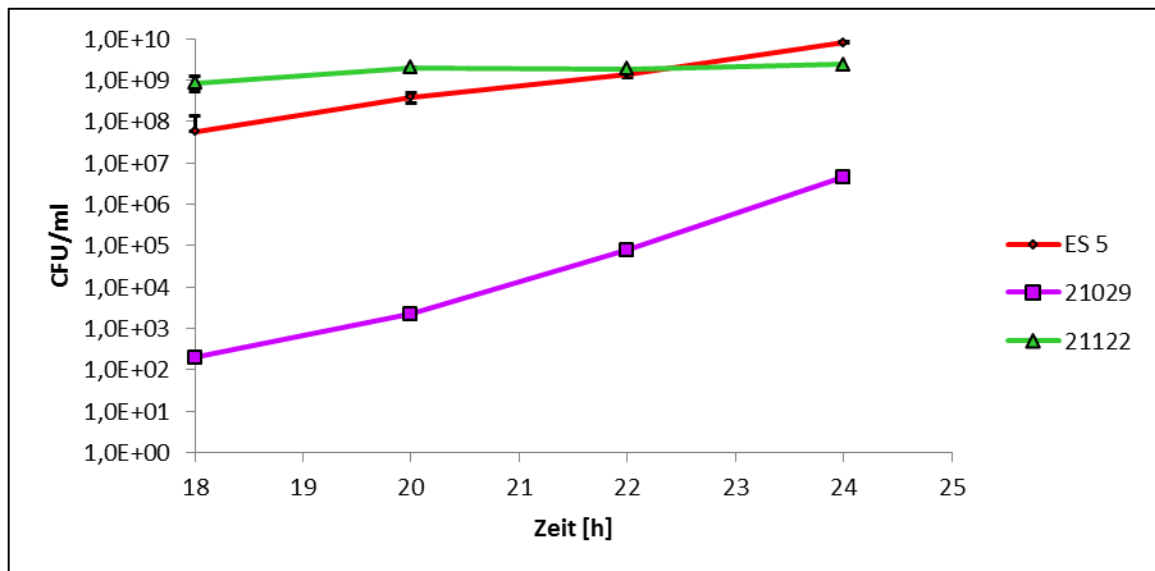


Abb. 20: Exemplarische Darstellung der Reaktivierung der VBNC-Zellen von *C. sakazakii*-Stämmen unter *in vitro* gastrointestinalen Bedingungen.

3. Phänotypische Analyse der *C. sakazakii*-Stämme im Zellkultursystem

Studien belegen, dass bei *C. sakazakii* eine Korrelation zwischen Biofilmbildung und der Persistenz außerhalb des Wirts besteht, jedoch gibt es bisher keine Verbindung zu seiner Virulenz. Ein Ziel dieser Arbeit war es daher, den Effekt des Biofilms auf das Kolonisationsverhalten von *C. sakazakii* zu untersuchen. Das Invasionspotential wurde mittels Gentamicinassay (*Gentamicin Protection Assay*) sowohl in nicht differenzierten als auch in ausdifferenzierten (polarisierten) Caco-2-Zellen als Modellsystem untersucht. Caco-2-Zellen sind humane Dickdarmadenokarzinomzellen, die in dieser Arbeit als *in*

vitro Modell den Darm als Ort der primären lokalen Infektion darstellen.

3.1. Untersuchung der Invasivität von *C. sakazakii*-Stämmen in Caco-2-Zelllinie

Um die Invasivität der ausgewählten *C. sakazakii*-Stämme zu untersuchen, wurde die Infektion mit Bakterien aus der logarithmischen Wachstumsphase durchgeführt. Dazu wurde aus der *C. sakazakii*-Übernachtskultur (17 h) zunächst ein zweiprozentiges Inokulum hergestellt und für zwei Stunden bei 37 °C und 250 rpm inkubiert. Anhand der CFU/ml des 2 % igen Inokulums wurde die MOI berechnet und der Caco-2-Monolayer infiziert. Nach 1,5 h Infektion wurde nach mehrmaligem Waschen Gentamicin-haltiges Medium zugegeben, um alle Bakterien, die sich außerhalb der eukaryotischen Zelle befinden, abzutöten. Zum Zeitpunkt $t=2,5$ h nach Zugabe der Infektionslösung wurden die infizierten Caco-2-Zellen lysiert und auf LB-Medium ausplattiert, um die CFU/ml von intrazellulären *C. sakazakii* bestimmen zu können. Diese wurde anschließend ins prozentuale Verhältnis zur Infektionslösung gesetzt, um den Anteil an eingedrungenen Bakterien, d.h. die Invasionsrate, zu ermitteln. Das Invasionsverhalten wurde sowohl mit nicht differenzierten als auch mit ausdifferenzierten (polarisierten) Caco-2-Zellen untersucht, um potentielle Unterschiede feststellen zu können (Abb. 21).

Es ist deutlich zu erkennen, dass die Invasivität aller Stämme in ausdifferenzierten Caco-2-Zellen höher ist als in undifferenzierten Caco-2-Zellen. Beim Vergleich des Infektionsverhaltens der einzelnen Stämme fällt auf, dass *C. sakazakii* ES 5 mit 1,4 % in undifferenzierten und mit 7,1 % in ausdifferenzierten Caco-2-Zellen die höchste Invasivität aufweist. Die *wzx*-Mutante von *C. sakazakii* ES 5 zeigt mit 1,03 % in nicht differenzierten und mit 5,9 % in ausdifferenzierten Caco-2-Zellen eine verminderte Invasivität im Vergleich zum Wildtyp. Dies ist ein Indiz dafür, dass LPS, welches durch die Deletion des *wzx*-Gens nicht mehr auf der Bakterienoberfläche vorhanden ist, eine Rolle bei der Invasion bzw. Adhäsion spielt. Der *C. sakazakii*-Stamm 21122 ist mit einer Invasionsrate von 0,05 % in nicht differenzierten und 1,73 % in ausdifferenzierten Caco-2-Zellen deutlich weniger invasiv als *C. sakazakii* ES 5 und seine *wzx*-Mutante. Den geringsten Invasionswert hat der stark biofilmbildende *C. sakazakii*-Stamm 21029 und seine *wzx*-Mutante, deren Invasionsrate in nicht differenzierten Caco-2-Zellen 0,003 % und in ausdifferenzierten Zellen 0,41 % (*C. sakazakii* 21029) bzw. 0,48 % (*C. sakazakii* 21029 Δwzx) beträgt.

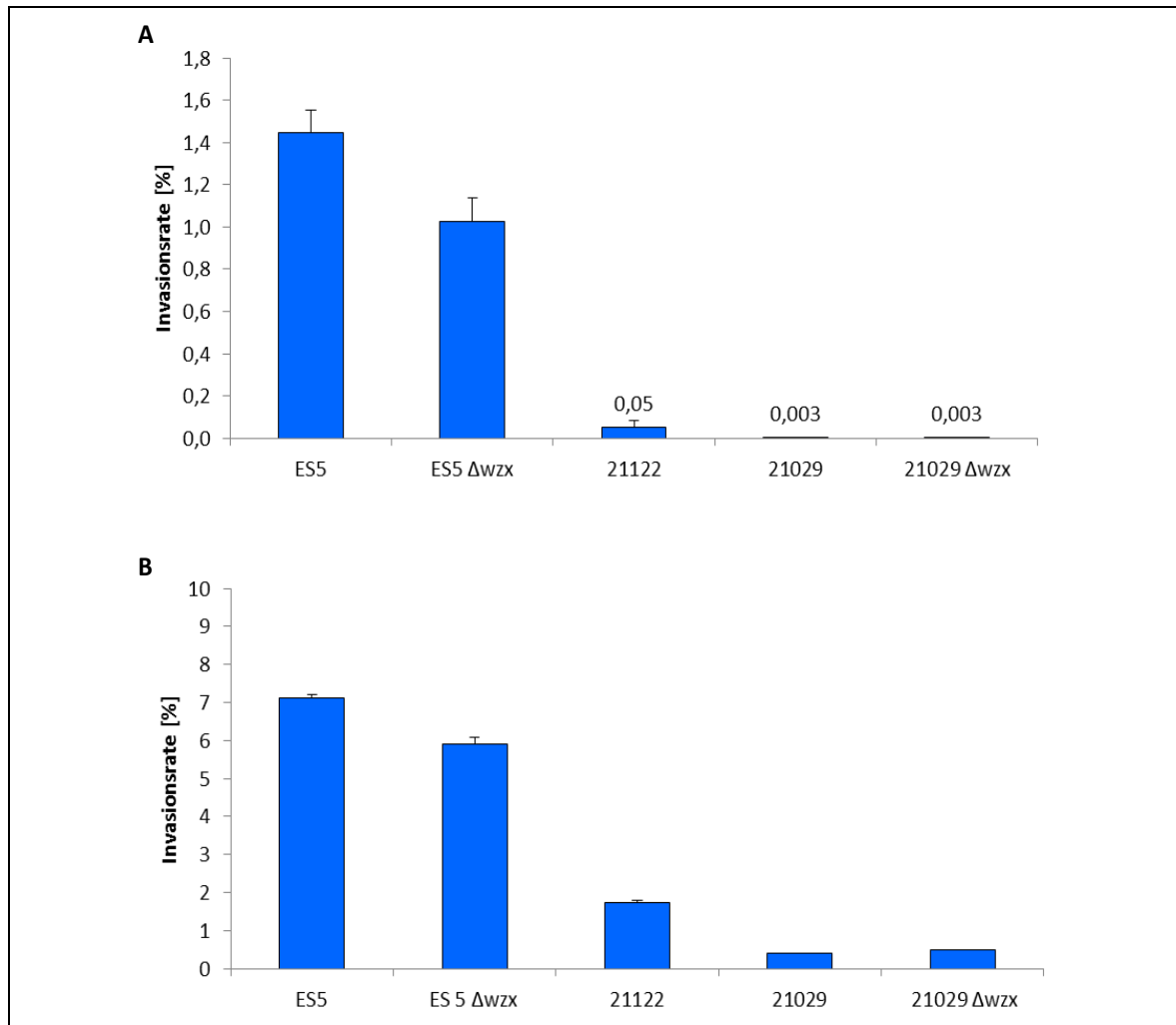


Abb. 21: Prozentuale Darstellung des Invasionsverhaltens ausgewählter *C. sakazakii*-Stämme in (A) undifferenzierten und in (B) ausdifferenzierten Caco-2-Zellen.

3.2. Untersuchung der Invasivität von Aggregaten und planktonischen Zellen aus dem Biofilm von *C. sakazakii*-Stämmen in Caco-2-Zelllinie

Um die Kolonisationsfähigkeit der *C. sakazakii*-Zellen aus dem Biofilm im Vergleich zu den planktonischen Zellen einer ÜNK zu untersuchen, wurde die Biofilmbildung der *C. sakazakii*-Stämme induziert, indem sie für 48 h bei Raumtemperatur in Minimalmedium inkubiert wurden. Anschließend wurden die Aggregatzellen von den planktonischen Zellen mittels differentieller Zentrifugation separiert und die Aggregatzellen durch kurzes Mörsern vereinzelt. Die Infektion des Caco-2-Monolayers erfolgte mit der MOI von 100. Das Invasionsverhalten von Aggregatzellen und planktonischen Zellen weist dabei deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen *C. sakazakii*-Stämmen auf (Abb. 22). Dabei fällt auf, dass die Invasionsraten von Aggregatzellen und planktonischen Zellen von *C. sakazakii* ES 5 und seiner *wzx*-Mutante am höchsten sind. So ist die Invasivität der Aggregatzellen von *C. sakazakii* ES 5 und der *wzx*-Mutante sowohl in undifferenzierte als auch in ausdifferenzierte Caco-2-Zellen um bis zu 10-fach höher als bei den *C. sakazakii*-

Stämmen 21122, 21029 und seiner *wzx*-Mutante. Die planktonischen Zellen von *C. sakazakii* ES 5 und der *wzx*-Mutante haben in den undifferenzierten Caco-2-Zellen sogar eine bis um den Faktor 20, bei den ausdifferenzierten Zellen eine bis um den Faktor 200 höhere Invasionsrate als die anderen *C. sakazakii*-Stämme. Vergleicht man die Invasionsraten der planktonischen Zellen mit denen der Aggregatzellen, so fällt auf, dass diese bei den nicht differenzierten Caco-2-Zellen um bis zu 1,5-fach höher sind. Die Abb. 22 zeigt, dass die Invasivität der Aggregatzellen bei den ausdifferenzierten Zellen um bis zu 3-mal höher ist als bei den nicht differenzierten Caco-2-Zellen. Bei den planktonischen *C. sakazakii*-Zellen hingegen liegt die Invasionsrate in undifferenzierte Caco-2-Zellen im Vergleich zu den ausdifferenzierten Zellen zwischen zwei und 20-mal höher.

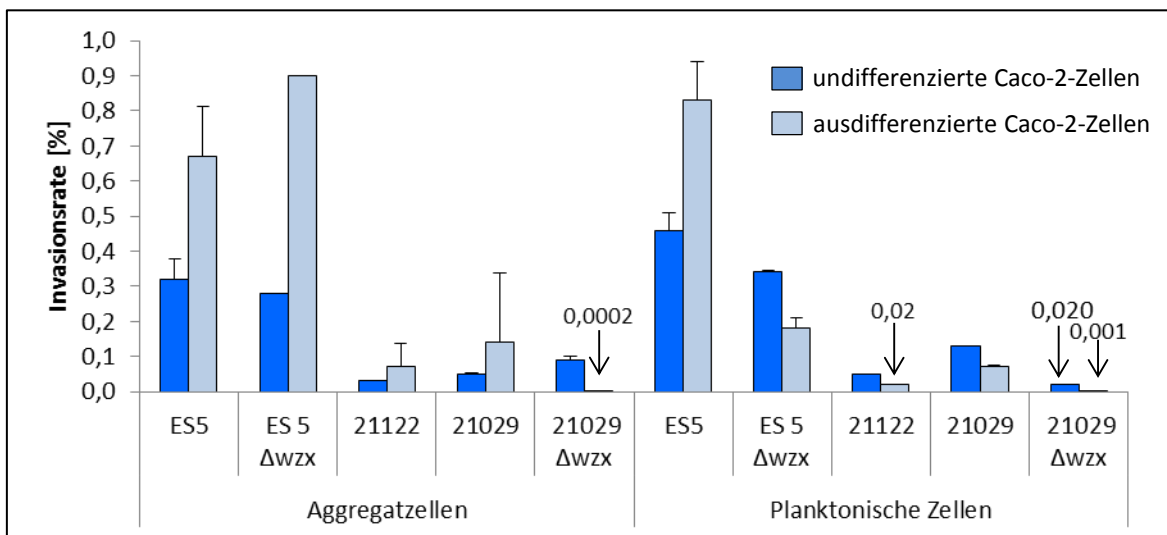


Abb. 22: Invasionsverhalten von Aggregatzellen und planktonischen Zellen von *C. sakazakii*-Stämmen in nicht differenzierte und ausdifferenzierte (polarisierte) Caco-2-Zellen.

3.3. Untersuchung der Kolonisation von Caco-2-Zellen durch *C. sakazakii* im VBNC-Stadium

Die Induktion des VBNC-Stadiums erfolgt durch Stresssituationen. In diesem Zustand ist die Stoffwechselaktivität des Bakteriums auf ein Minimum reduziert. Um den Einfluss dieser Anpassung auf die Virulenz des Bakteriums zu untersuchen, wurden polarisierte Caco-2-Zellen mit VBNC-Zellen von *C. sakazakii* infiziert, die über einen Zeitraum von vier Monaten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert wurden. Aufgrund der unbekannten Bakterienzahl in der Infektionslösung musste der Standard-Invasionsassay modifiziert werden, um die Vergleichbarkeit der einzelnen *C. sakazakii*-Stämme zu gewährleisten. Dazu wurde basierend auf den Ergebnissen in Kapitel IV.2.4, in dem die Reaktivierung der VBNC-Zellen unter *in vitro* Darmbedingungen im Caco-2-Kulturüberstand untersucht wurde, vorab für jeden *C. sakazakii*-Stamm und Zustand

(Aggregatzellen bzw. planktonische Zellen) einzeln der Zeitpunkt ermittelt, an dem der Bakterientiter 10^6 CFU/ml beträgt. Zu diesem Zeitpunkt wurden im modifizierten Gentamicinassay durch Zugabe von Gentamicin-haltigem Medium extrazelluläre Bakterien abgetötet und der Anteil an eingedrungenen Bakterien durch Reisolierung ermittelt. Um Rückschlüsse auf die Überlebens- und Proliferationsfähigkeit in der Darmepithelzelle ziehen zu können, wurden darüber hinaus in regelmäßigen Abständen Caco-2-Zellen lysiert und die CFU/ml an intrazellulären Bakterien bestimmt. Die Abb. 23 A stellt die Reaktivierung der VBNC-Zellen in purem Caco-2-Kulturüberstand dar, deren CFU/ml zeitgleich zu den Lyse-Zeitpunkten im Infektionsversuch ermittelt wurde. In Abb. 23 B ist der Anteil an eingedrungenen Bakterien ab einer Stunde nach Zugabe von Gentamicin-haltigem Medium ($t=0$ h) sowie die intrazelluläre Proliferation bis 48 h nach Gentamicin-Zugabe dargestellt. Mit Ausnahme der Aggregatzellen von *C. sakazakii* 21122 waren alle VBNC-Zellen, die sich im Caco-2-Kulturüberstand reaktivierten, in der Lage, in die Caco-2-Zelle einzudringen und darüber hinaus in ihr zu persistieren. Die Aggregatzellen von *C. sakazakii* 21029 und die *wzx*-Mutanten der *C. sakazakii*-Stämme ES 5 und 21029 reaktivierten sich über die gesamte Dauer des Versuchs nicht und waren daher nicht im Caco-2-Kulturüberstand und intrazellulär in den Caco-2-Zellen nachzuweisen. Der Anteil an eingedrungenen Bakterien beträgt bei den Aggregatzellen von *C. sakazakii* ES 5 in Bezug auf die Gesamtmenge an reaktivierten VBNC-Zellen im Caco-2-Kulturüberstand eine Stunde nach Gentamicin-Zugabe ($t=0$ h) 0,22 % und bei den planktonischen Zellen 0,009 % (ES 5), 0,07 % (ES 5 Δwzx), 0,006 % (21122), 0,0006 % (21029) und 0,00002 % (21029 Δwzx). Ab dem Zeitpunkt der Gentamicin-Zugabe ist bei den Aggregatzellen von *C. sakazakii* ES 5 und bei den planktonischen Zellen der *C. sakazakii*-Stämme ES 5 und ES 5 Δwzx eine konstante Zellzahl zu erkennen, was auf die Persistenz der Bakterien in der Wirtszelle schließen lässt. Die Zellzahl der planktonischen Zellen von *C. sakazakii* 21122 hingegen nimmt im Verlauf der Versuchsdurchführung sogar insgesamt um 3 log-Stufen ab. Dagegen proliferieren die Bakterienzellen von *C. sakazakii* 21029 und seiner *wzx*-Mutante zunächst ($t=25$ h) und gehen anschließend ebenfalls in den persistierenden Zustand über (Abb. 23 B).

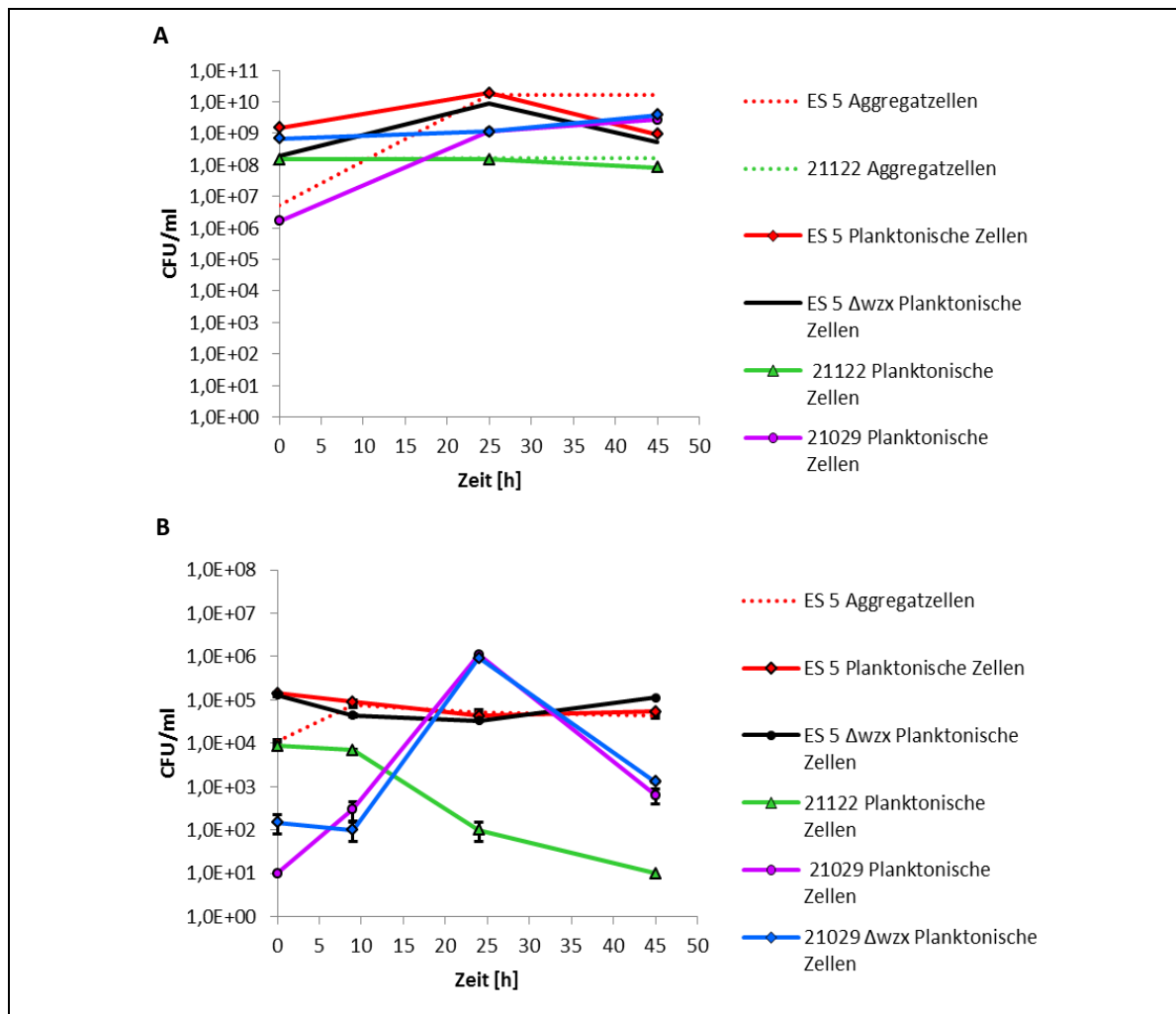


Abb. 23: Reaktivierung der VBNC-Zellen ausgewählter *C. sakazakii*-Stämme im Caco-2-Kulturüberstand (A) und Kolonisationsverhalten in polarisierten Caco-2-Zellen (B).

4. Untersuchung der Kolonisation von *C. sakazakii* ES 5 in Gegenwart von pathogenen und probiotischen Bakterien

Säuglingsnahrung auf Milchpulverbasis ist ein hochsensibles Lebensmittel, dessen Herstellungsprozess hohen Hygiene- und Qualitätsstandards unterliegt. Trotzdem besteht das Risiko einer extrinsischen Kontamination mit pathogenen Keimen, die bei Säuglingen schwerwiegende Erkrankungen hervorrufen können. Dazu zählen z.B. Lebensmittel assoziierte Keime, wie *C. sakazakii*, *Listeria monocytogenes* und der Toxinbildner *Bacillus cereus*, die insbesondere bei immunkompromittierten Personengruppen (wie z.B. bei Säuglingen, Schwangeren, alten und immunsupprimierten Menschen) lebensbedrohliche Erkrankungen hervorrufen können. Aufgrund des ubiquitären Vorkommens der Erreger, sind alle Schritte des Herstellungsprozesses (z.B. Grundbestandteile, Gefriertrocknung), die Rekonstitution, als auch falsche Aufbewahrungs- oder Hygienemaßnahmen als mögliche Eintragsquellen in Betracht zu ziehen. Um das Risiko einer Infektion zu verringern, bieten einige Hersteller von Säuglingsnahrung ihre Produkte mit einem Zusatz von probiotischen Mikroorganismen an, welche bei Zufuhr in angemessener Menge, die Gesundheit fördern sollen (FAO/WHO, 2006). Bisher liegen jedoch keine klinischen Studien vor, welche die prophylaktische Wirksamkeit von Probiotika gegenüber einer *C. sakazakii*-Infektion belegen. Um zu untersuchen, ob die pathogene Begleitflora einen positiven oder negativen Einfluss auf das Invasionsverhalten von *C. sakazakii* hat und um zu evaluieren, ob probiotische Bakterien vor einer Infektion mit *C. sakazakii* schützen, wurde die Kolonisationsfähigkeit von *C. sakazakii* ES 5 mittels Ko-Infektion *in vitro* im Zellkultursystem an den humanen Darmepithelzellen Caco-2 und HT-29 untersucht. Als pathogene Begleitkeime wurden der Toxinbildner *B. cereus* F837/76 und *L. monocytogenes* EGD ausgewählt, da sie in Milcherzeugnissen oft vorkommen. Die probiotischen *Lactobacillus*-Stämme *L. casei*, *L. rhamnosus* und *L. helveticus*, die aus Milcherzeugnissen isoliert wurden, bildeten die probiotische Begleitflora.

4.1. Zytotoxizitätsanalyse von *B. cereus* F837/76 auf Caco-2-Zellen

B. cereus ist ein ubiquitäres Lebensmittel-Pathogen, das durch die Bildung von Toxinen eine Schädigung der eukaryotischen Zellen bewirkt. Die Porenbildung führt zu einer Schädigung der epithelialen Membran, die durch einen WST-Bioassay gemessen werden kann. Um standardisierte Bedingungen zu einer „Vorschädigung“ der Darmepithelzellen für die Ko-Infektion mit *C. sakazakii* ES 5 zu etablieren, wurde zunächst die zytotoxische Aktivität von *B. cereus*-Kulturen in unterschiedlichen Nährmedien mittels eines WST-

Bioassay analysiert.

Die Abb. 24 zeigt, dass die Messung des reziproken Titors die höchste Zytotoxizität bei der Anzucht in CGY-Medium, welches standardmäßig zur Gewinnung von toxinhaltigen Überständen verwendet wird, ergibt. Bei der Anzucht von *B. cereus* F837/76 in LB- bzw. in BHI-Medium ist die Zytotoxizität der sterilen Überstände deutlich geringer. Im Vergleich zur Kultivierung in CGY-Medium mit einem gemessenen reziproken Titer von 1:1042 beträgt dieser bei Anzucht in BHI-Medium nur 1:515 bzw. in LB-Medium 1:360 (Abb. 24).

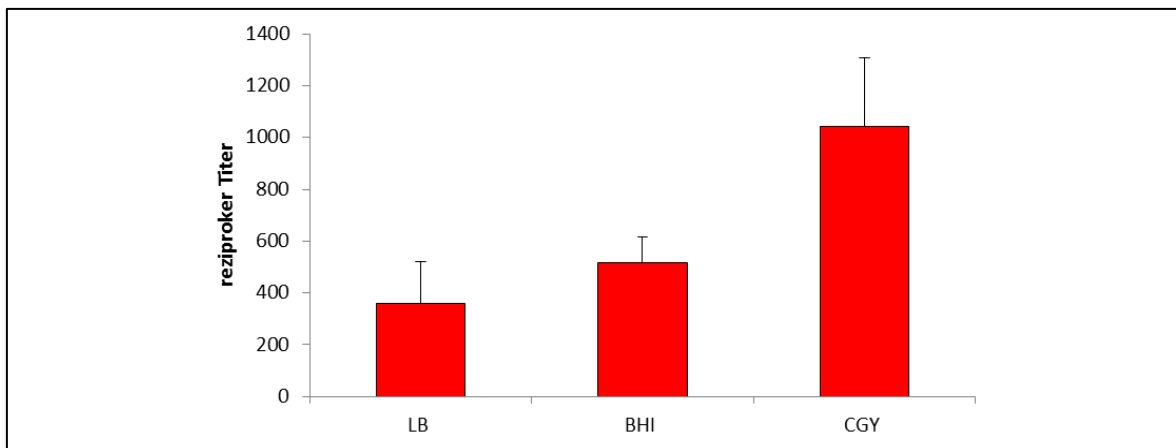


Abb. 24: Zytotoxizität der Übernachtskultur von *B. cereus* F837/76 in verschiedenen Medien.

Basierend auf dem Ergebnis des Zytotoxizitätstests, welcher für *B. cereus* F837/76 die höchste toxische Aktivität bei Kultivierung in CGY-Medium nachweisen konnte (Abb. 24), wurde die Vitalität der Caco-2-Zellen während der Inkubation mit *B. cereus* F837/76 über einen Zeitraum von 5-15 Minuten untersucht, indem die Darmzellen mittels Trypanblau angefärbt und die Vitalität der Zellen mikroskopisch bewertet wurde. Anhand der Blaufärbung der Zellen, die durch den Einstrom des Farbstoffs in tote Zellen hervorgerufen wird, konnte die Vitalität der Caco-2-Zellen beurteilt werden. Mit dieser Methode sollte der Zeitpunkt definiert werden, an dem die Caco-2-Zellen durch *B. cereus*-Toxine leicht geschädigt aber vital sind, um anschließend eine Ko-Infektion mit *C. sakazakii* ES 5 durchzuführen zu können. Untersuchungen von Jessberger *et al.* (2014) zur Zytotoxizität von *B. cereus* ergaben durch Messung des Propidiumiodid-Einstroms in epitheliale Lungenkarzinomzellen (A549) einen zytotoxischen Effekt bereits 5-7 Minuten nach Zugabe des toxinhaltigen Überstands von *B. cereus* F837/76. Dieses Ergebnis konnte in dieser Arbeit für die Caco-2-Zelllinie bestätigt werden.

In der Abb. 25 ist zu erkennen, dass bereits nach 5-minütiger Inkubation eine deutliche Blaufärbung der Caco-2-Zellen stattgefunden hat (Abb. 25 A), was auf die Schädigung der

Membran und die Diffusion des Farbstoffs in die Zelle zurückzuführen ist. Im Vergleich dazu ist bei der Kontrolle (Abb. 25 D) keine Blaufärbung zu sehen, da die Caco-2-Zellen eine intakte Membran aufweisen.

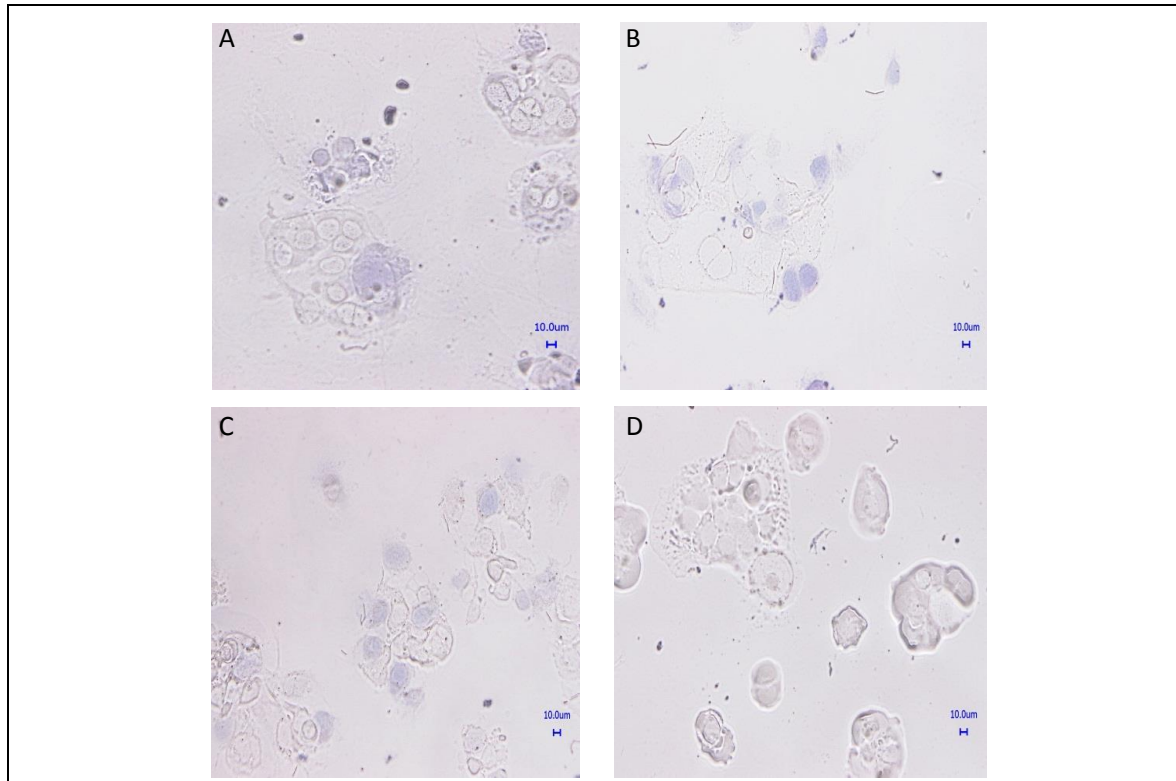


Abb. 25: Phasenkontrastaufnahme der Caco-2-Zellen nach Inkubation mit *B. cereus*-ÜNK für (A) 5 min, (B) 10 min, (C) 15 min im Vergleich zu (D) unbehandelten Caco-2-Zellen.

4.2. Wachstumskinetik von *C. sakazakii* ES 5 und *B. cereus* F837/76 in einer Ko-Kultur

Um das Wachstumsverhalten von *C. sakazakii* ES 5 während einer Ko-Kultivierung mit *B. cereus* F837/76 zu untersuchen, wurden beide Pathogene in RPMI-Medium, welches im Gentamicinassay verwendet wird, über einen Zeitraum von fünf Stunden zusammen kultiviert. In Abb. 26 sind die stündlich ermittelten CFU/ml-Werte der Kultur (in Form von Balken) der optischen Dichtemessung (Kurvenverlauf) gegenübergestellt. Um zwischen den beiden Stämmen bei der CFU-Bestimmung differenzieren zu können, wurde die Ko-Kultivierung mit *C. sakazakii* ES 5^{Amp}, einem Derivat von *C. sakazakii* ES 5 durchgeführt. Dieser *C. sakazakii*-Stamm besitzt den pDiGi-Vektor, auf dem sich eine Ampicillin-Resistenz-Kassette befindet. Somit war es möglich, auf LB-Nährboden mit Zusatz von Ampicillin, das Wachstum von *B. cereus* zu hemmen. Übereinstimmend mit der Versuchsdurchführung vom Gentamicinassay wurde aus der *C. sakazakii* ES 5-Übernachtskultur zunächst ein 2 % iges Inokulum hergestellt und für zwei Stunden bei 37 °C inkubiert, sodass sich *C. sakazakii* ES 5 zu Versuchsbeginn in der logarithmischen

Wachstumsphase befand. In der Abb. 26 ist deutlich erkennbar, dass die nach fünfständiger Inkubation höhere optische Dichte von *C. sakazakii* ES 5 und *B. cereus* F837/76 nicht im Zusammenhang mit einem höheren Bakterientiter stehen, da die CFU/ml-Werte im Zeitraum von zwei bis vier Stunden relativ konstant bleiben, sowohl wenn die beiden Pathogene alleine als auch zusammen kultiviert werden. Da die Lichtabsorption bei der Messung der optischen Dichte nicht nur von der Dichte der Bakterienkultur abhängt, sondern auch von der Fähigkeit des Stamms, Aggregate und Pigmente zu bilden, muss diese unter Vorbehalt interpretiert werden. Die Ko-Kultivierung der beiden Stämme zeigt keine gegenseitige Hemmung im Wachstum, sondern hat sogar einen positiven Effekt auf das Wachstum während der fünf Stunden Inkubation. Dieser Effekt wird durch die Erhöhung der CFU/ml-Werte um mehr als das 6-fache bei *C. sakazakii* ES 5 und um das 11-fache bei *B. cereus* F837/76 deutlich (Abb. 26).

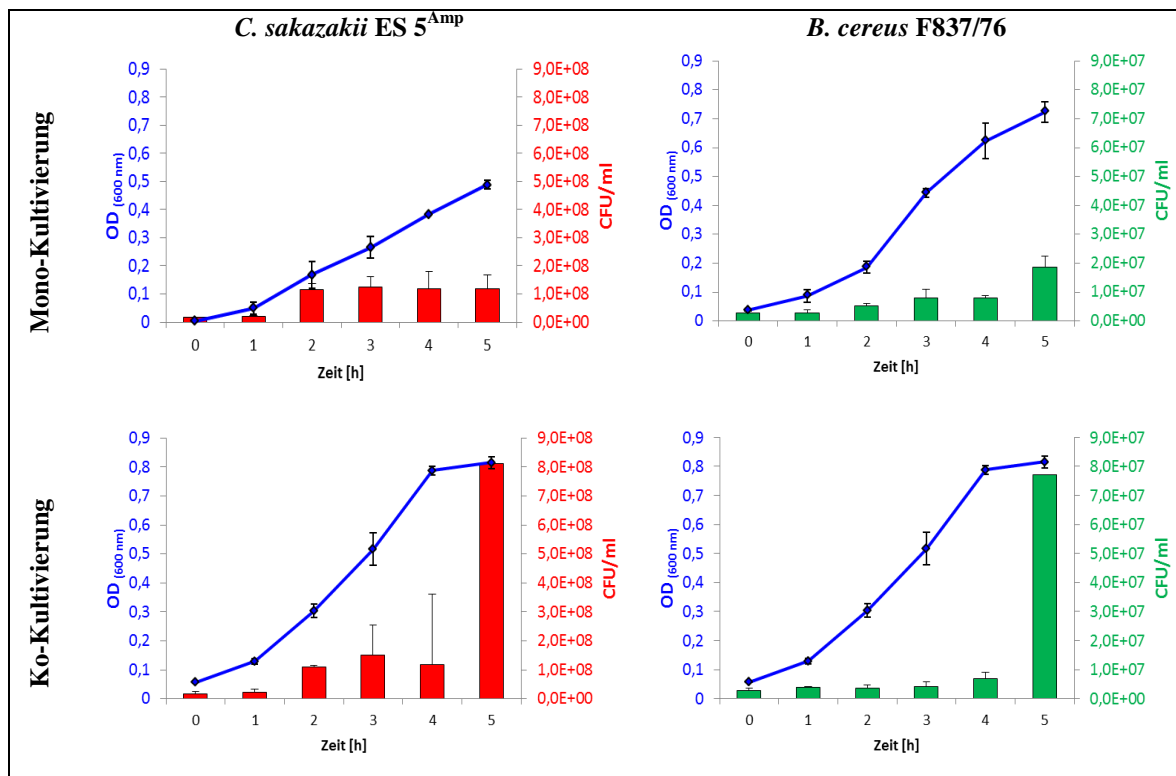


Abb. 26: Wachstum von *C. sakazakii* ES 5^{Amp} und *B. cereus* F837/76 während einer Ko-Kultivierung in RPMI-Medium im Vergleich zur Mono-Kultivierung der beiden Stämme.

4.3. Untersuchung der Kolonisationsfähigkeit von *C. sakazakii* ES 5^{Amp} nach Vorbehandlung der Darmepithelzellen Caco-2 und HT-29 mit *B. cereus*-Kultur

Basierend auf der phänotypischen Auswertung in Kapitel IV.4.1, in der eine ausreichend zytotoxische Wirkung der *B. cereus*-Übernachtkultur auf Caco-2-Zellen ab fünf Minuten Inkubation nachgewiesen wurde, sowie auf Grundlage des Ergebnisses des Zytotoxizitätstest, bei dem die höchste zytotoxische Aktivität von *B. cereus* nach

Kultivierung in CGY-Medium ermittelt werden konnte, wurden Standardbedingungen für einen modifizierten Gentamicinassay etabliert, anhand dessen der Einfluss des Toxinbildners *B. cereus* F837/76 auf die Kolonisationsfähigkeit von *C. sakazakii* ES 5 untersucht wurde. Die Infektionsversuche wurden *in vitro* mit polarisierten Caco-2-Zellen und mit Mukus produzierenden HT-29-Zellen durchgeführt, um den Darm als Ort der primären lokalen Infektion zu simulieren und mögliche Unterschiede zwischen den beiden Darmzelllinien zu detektieren. Die Zellen wurden zunächst für fünf Minuten mit einer *B. cereus* F837/76-Lösung (MOI=10) inkubiert und anschließend nach mehreren Waschschritten mit *C. sakazakii* ES 5^{Amp} (MOI=10) infiziert. Zu den Zeitpunkten t=30' (Adhäsion), t=2,5 h (Invasion) sowie t=7/24/72 h (Proliferation) erfolgte die Lyse der eukaryotischen Zellen durch Zugabe von eiskaltem Triton (0,1 %). Um die CFU/ml von *C. sakazakii* bestimmen zu können, wurde ein von Dr. K. Schauer konstruiertes Derivat von *C. sakazakii* ES 5 verwendet, welches einen pDiGi-Vektor mit einer Ampicillin-Resistenz-Kassette trägt. Dieser Selektionsmarker ermöglicht das Wachstum von *C. sakazakii* ES 5^{Amp} bei gleichzeitiger Hemmung des *B. cereus*-Wachstums auf Ampicillin-haltigen Nährböden. Die ermittelten CFU-Werte wurden je nach Lyse-Zeitpunkt ins prozentuale Verhältnis zur Infektionslösung (=Adhäsionsrate), zur Adhäsion (=Invasionsrate) und zur Invasion (=Proliferationsrate) gesetzt.

In der Abb. 27 sind sowohl die Adhäsions-, Invasions- und Proliferationsraten von *C. sakazakii* ES 5^{Amp} in ausdifferenzierten Caco-2- (A) und HT-29-Zellen (B), mit und ohne *B. cereus*-Inkubation, dargestellt. Die Kolonisationsraten je Zeitpunkt (Adhäsion, Invasion und Proliferation) von *C. sakazakii* ES 5^{Amp} zeigen deutlich ein spezifisches Kolonisationsverhalten von *C. sakazakii* ES 5^{Amp} in den verschiedenen Darmzelllinien (Abb. 27 A, B), die sich hinsichtlich ihrer Zelloberfläche unterscheiden. Dabei fällt auf, dass die Kolonisationsraten bei den HT-29-Zellen zu allen Lyse-Zeitpunkten deutlich niedriger sind als bei den polarisierten Caco-2-Zellen. In den Caco-2-Zellen, die vor der *C. sakazakii* ES 5^{Amp}-Infektion mit *B. cereus* F837/76 vorinkubiert wurden, ist die Invasionsrate mit 173,83 % deutlich höher im Vergleich zu der Invasionsrate in Caco-2-Zellen, die zuvor nicht mit *B. cereus* F837/76 inkubiert wurden und 0,91 % beträgt (Abb. 27 A). Dies ist ein Indiz für den positiven Einfluss der Porenbildung auf die Kolonisationsfähigkeit von *C. sakazakii*. Die Abnahme der Proliferationsrate bei *C. sakazakii* ES 5^{Amp} in den Caco-2-Zellen zum Zeitpunkt t=24 h ist auf den Zelltod der eukaryotischen Zellen infolge der kontinuierlichen Vermehrung der intrazellulären *C. sakazakii*-Bakterien und der damit verbundenen Überlastung der Caco-2-Zelle

zurückzuführen. Diese intrazelluläre Replikation findet zwar auch bei der mitgeführten *C. sakazakii* ES 5^{Amp}-Kontrolle statt, jedoch sind aufgrund der intakten Zellmembran zum Zeitpunkt der Infektion weniger *C. sakazakii* ES 5^{Amp}-Bakterien in die Caco-2-Zelle eingedrungen als bei Caco-2-Zellen, die zuvor mit *B. cereus* F837/76 inkubiert wurden (Abb. 27 A). Der erneute Anstieg der Proliferationsrate zu den darauf folgenden Zeitpunkten (t=48-72 h) resultiert aus der intrazellulären Vermehrung von *C. sakazakii* ES 5^{Amp} in Caco-2-Zellen, in die von Anfang an weniger Bakterien eingedrungen sind (Abb. 27 A). Die Zunahme in der Proliferationsrate bei der *C. sakazakii* ES 5^{Amp}-Kontrolle in Caco-2-Zellen bis 48 h nach Zugabe der Infektionslösung, lässt auf die kontinuierliche Vermehrung der Bakterienzellen schließen. Anschließend stagniert die Proliferationsrate, da die Bakterien in den persistierenden Zustand übergehen.

In HT-29-Zellen liegt die Invasionsrate von *C. sakazakii* ES 5^{Amp} mit 0,1 % trotz der Inkubation mit *B. cereus* F837/76 nur geringfügig höher als die Invasionsrate der *C. sakazakii* ES 5^{Amp}-Kontrolle mit 0,08 %. Die intrazelluläre Replikation der Bakterien resultiert schließlich in einer deutlich höheren Proliferationsrate zum Zeitpunkt t=7 h nach Zugabe der Infektionslösung. Diese beträgt bei HT-29-Zellen, die zuvor mit *B. cereus* F837/76 inkubiert wurden bei 479 % und liegt somit deutlich höher als die Proliferationsrate der *C. sakazakii* ES 5^{Amp}-Kontrolle mit 83 %. Ab diesem Zeitpunkt gehen die Bakterien in den persistierenden Zustand über, sodass die Proliferationsphase im Vergleich zu der in Caco-2-Zellen deutlich kürzer ist (Abb. 27 B).

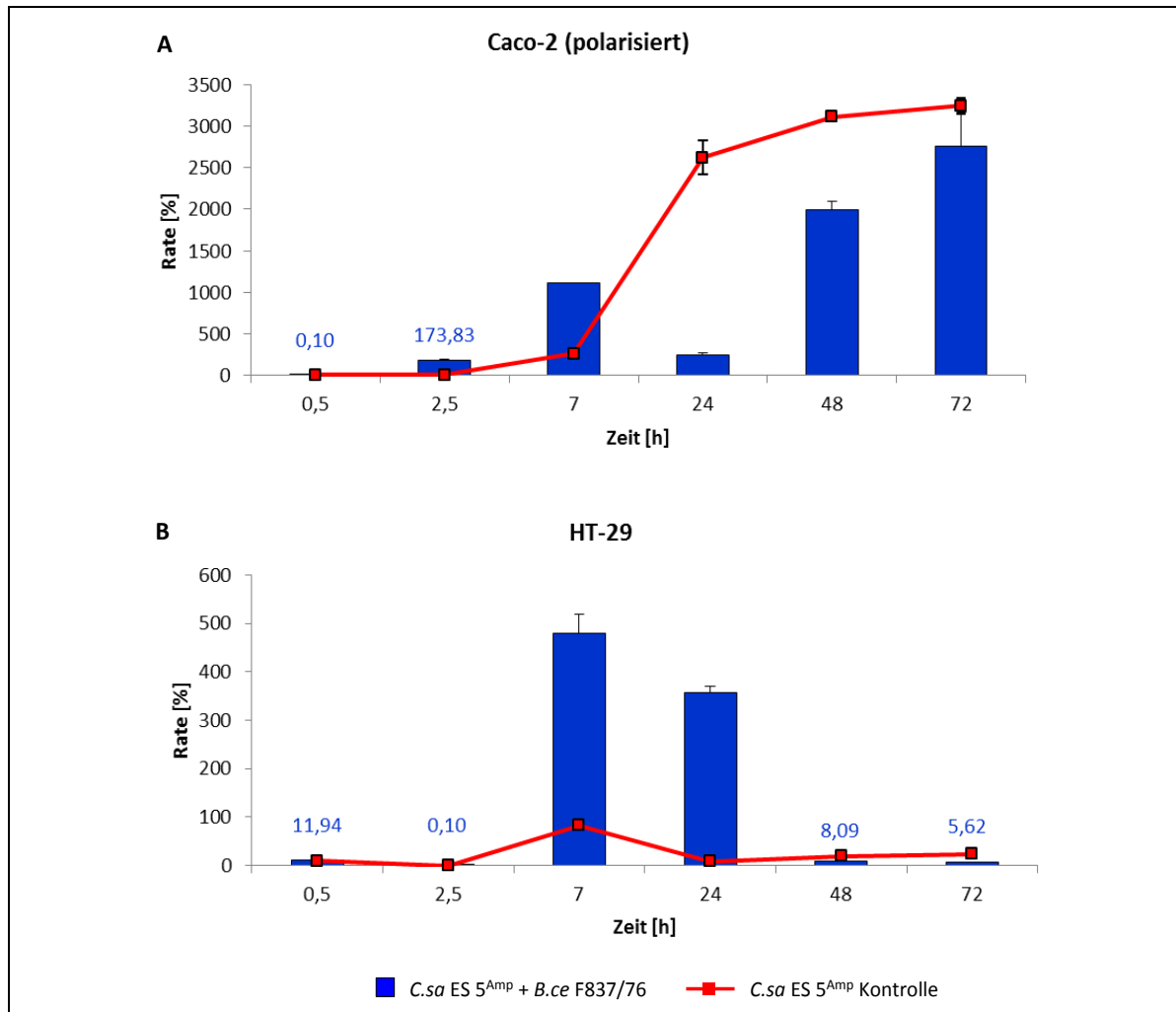


Abb. 27: Prozentuale Darstellung des Kolonisationsverhaltens von *C. sakazakii* ES 5^{Amp} in (A) polarisierte Caco-2- und (B) HT-29-Zellen mit und ohne (*C. sakazakii* ES 5^{Amp}-Kontrolle) Inkubation mit *B. cereus* F837/76.

4.4. Untersuchung der Kolonisation von *C. sakazakii* ES 5 in die Darmepithelzellen Caco-2 und HT-29 in Ko-Infektion mit *L. monocytogenes*

Bei der Adhäsion von Listerien an die Oberfläche von Darmepithelzellen kommt es zu Wechselwirkungen zwischen listeriellen Proteinen und Oberflächenmolekülen der Wirtszelle, die eine Umstrukturierung des Zytoskeletts und eine Internalisierung des Pathogens bewirken. Dieser Prozess findet an *tight junctions*, also an Zellkontakten benachbarter Epithelzellen statt, die auch bei der Infektion mit *C. sakazakii* eine große Rolle spielen. Laut Kim und Lössner (2008) fördern zerstörte *tight junctions* deutlich die Invasion von *C. sakazakii*. In Anbetracht dessen, dass *L. monocytogenes* und *C. sakazakii* gemeinsam in kontaminierten Lebensmitteln und somit auch im Wirtszellorganismus vorkommen können, stellte sich die Frage, ob *L. monocytogenes* durch Remodellierung der Wirtszelloberfläche einen positiven Einfluss auf die Invasivität von *C. sakazakii* hat und dessen Invasion erleichtert. Daher wurde in dieser Arbeit mittels Ko-Infektion die

Kolonisationsfähigkeit von *C. sakazakii* ES 5 *in vitro* an ausdifferenzierten Caco-2-Zellen und HT-29-Zellen untersucht. Dazu wurden die Darmepithelzellen für 30 Minuten mit *L. monocytogenes* EGD-*gfp* (MOI=10) inkubiert und anschließend, nach mehreren Waschschritten zur Entfernung nicht adhärierter *L. monocytogenes*-Zellen, mit *C. sakazakii* ES 5 (MOI=10) infiziert. Zu den Zeitpunkten $t=30'$ (=Adhäsion), $t=2,5$ h (=Invasion) und $t=7/24/72$ h (=Proliferation) nach Zugabe der Infektionslösung, wurden die Zellen lysiert und die CFU/ml bestimmt, wobei sich die Lyse-Zeitpunkte auf die Zugabe von *C. sakazakii* ES 5 beziehen. Die Differenzierung zwischen *C. sakazakii*- und *L. monocytogenes*-Kolonien war aufgrund des fehlenden Wachstums von *L. monocytogenes* auf LB-Agar unproblematisch. Um die CFU/ml von *L. monocytogenes* bestimmen zu können, wurde ein von Dr. K. Schauer konstruiertes Derivat von *L. monocytogenes* EGD verwendet, welches einen pIMK2-*gfp*-Vektor mit einer Kanamycin-Resistenz-Kassette trägt. Dieser Selektionsmarker ermöglicht das Wachstum von *L. monocytogenes* EGD-*gfp* bei gleichzeitiger Wachstumsinhibition von *C. sakazakii* ES 5 auf Kanamycin-haltigen Nährböden. Die Lyse-Zeitpunkte sowie die Berechnung der Adhäsions-, Invasions- und Proliferationsrate erfolgte wie in Kapitel IV.4.3 beschrieben.

In der Abb. 28 sind die Adhäsions-, Invasions- und Proliferationsraten von *C. sakazakii* ES 5 in ausdifferenzierten Caco-2 (A) und HT-29-Zellen (B), die mit *L. monocytogenes* EGD-*gfp* vorbehandelt wurden (Balken), den o.g. Raten der nicht vorbehandelten Epithelzellen in Form eines Kurvenverlaufs (rot) gegenübergestellt. Die Abb. 28 A verdeutlicht, dass in mit *L. monocytogenes* EGD-*gfp* vorinkubierten und infizierten Caco-2-Zellen die Adhäsionsrate von *C. sakazakii* ES 5 mit 22,9 % geringfügig, die Invasionsrate mit 26,6 % deutlich höher ist als die Adhäsion (21,1 %) und die Invasion (0,6 %) unter Standardbedingungen. Die deutlich niedrigeren Raten ab sieben Stunden nach Zugabe der Infektionslösung im Vergleich zum Kontrollansatz deuten darauf hin, dass intrazelluläre *C. sakazakii* ES 5-Zellen in Anwesenheit von *L. monocytogenes* EGD-*gfp* in der Darmepithelzelle persistieren und sich nicht, wie in Abwesenheit von *L. monocytogenes* EGD-*gfp*, intrazellulär replizieren (Abb. 28 A). Dieser persistierende Zustand von *C. sakazakii* ES 5 ist auf die Überlastung der eukaryotischen Zelle und die intrazelluläre Konkurrenz mit *L. monocytogenes* EGD-*gfp* zurückzuführen.

In HT-29-Zellen ist die Adhäsions- und Invasionsrate von *C. sakazakii* ES 5 annähernd gleich zu der der *C. sakazakii* ES 5-Kontrolle, jedoch ist die Proliferationsrate sieben Stunden nach Zugabe der Infektionslösung mit 137 % im Vergleich zur Kontrolle mit 83,5 % deutlich höher. Zum Zeitpunkt 24 h *p. i.* ist ein deutlicher Rückgang der Rate um

132 % zu beobachten.

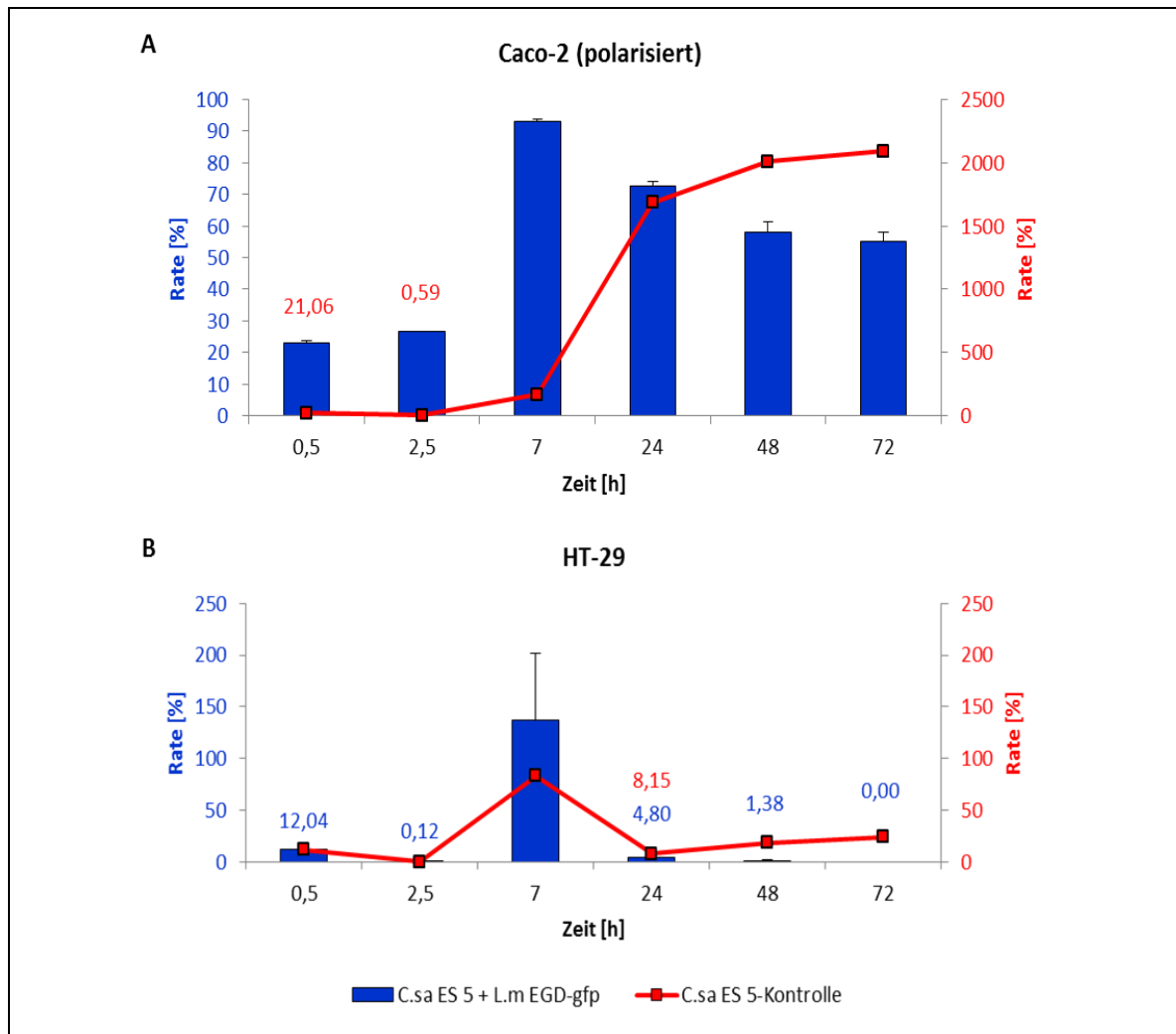


Abb. 28: Prozentuale Darstellung des Kolonisationsverhaltens von *C. sakazakii* ES 5 in Caco-2-Zellen (A) und HT-29-Zellen (B) in Ko-Infektion mit *L. monocytogenes* EGD-*gfp* im Vergleich zum Standard-Gentamicinassay.

4.5. Untersuchung der Kolonisation von *C. sakazakii* ES 5 in mit *B. cereus* F837/76 vorinkubierten Darmepithelzellen Caco-2 und HT-29 in Ko-Infektion mit *L. monocytogenes*

Nachdem in den Kapiteln IV.4.3 und IV.4.4 der positive Effekt einer Vorinkubation der Wirtszelle durch *B. cereus* F837/76 auf die Virulenz von *C. sakazakii* ES 5 sowie die invasionsfördernde Wirkung von *L. monocytogenes* EGD-*gfp* während der Internalisierung gezeigt werden konnte, wurde der simultane Einfluss der beiden Gram-positiven Pathogene auf die Virulenz von *C. sakazakii* ES 5 in einer Ko-Infektion untersucht. Dazu wurden die ausdifferenzierten Caco-2- und HT-29-Zellen für fünf Minuten mit *B. cereus* F837/76 (MOI=10) vorinkubiert und anschließend eine Ko-Infektion mit *C. sakazakii* ES 5^{Amp} (MOI=10) und *L. monocytogenes* EGD-*gfp* (MOI=10) durchgeführt. Zum Zeitpunkt $t=2,5$ h nach Zugabe der Infektionslösung wurden die Bakterien durch Lyse der

eukaryotischen Zelle reisoliert und die CFU/ml auf Selektivnährboden bestimmt. Parallel dazu wurde die Invasionsrate von *C. sakazakii* ES 5^{Amp} zum Zeitpunkt t=2,5 h und von *L. monocytogenes* EGD-gfp 2 h nach Zugabe der Infektionslösung II in unbehandelten Caco-2- und HT-29-Zellen bestimmt, die im Folgenden als „Kontrolle“ bezeichnet werden. Die dargestellten Kolonisationsraten entsprechen dem Anteil der eingedrungenen Bakterien nach Gentamicin-Zugabe und wurden ins prozentuale Verhältnis zur Infektionslösung gesetzt.

In Abb. 29 ist deutlich zu erkennen, dass sowohl die Invasionsrate von *C. sakazakii* ES 5^{Amp} als auch die von *L. monocytogenes* EGD-gfp in Caco-2-Zellen, die zuvor mit *B. cereus* F837/76 vorinkubiert wurden, deutlich höher ist als in unbehandelten Caco-2-Zellen. Darüber hinaus ist der Anteil an intrazellulären Bakterien bei *C. sakazakii* ES 5^{Amp} höher als bei *L. monocytogenes* EGD-gfp, obwohl diese aus denselben Wirtszellen reisoliert wurden. Das Invasionsverhalten von *L. monocytogenes* EGD-gfp in HT-29-Zellen entspricht dem in Caco-2-Zellen, allerdings ließen sich bei den mit *B. cereus* F837/76 vorinkubierten Zellen keine *C. sakazakii* ES 5^{Amp}-Zellen reisolieren. Auch die Invasionsrate der *C. sakazakii* ES 5^{Amp}-Kontrolle in HT-29-Zellen ist mit 0,01 % vergleichsweise gering, was dafür spricht, dass die Invasivität von *C. sakazakii* ES 5^{Amp} von der jeweiligen Zelllinie abhängig ist.

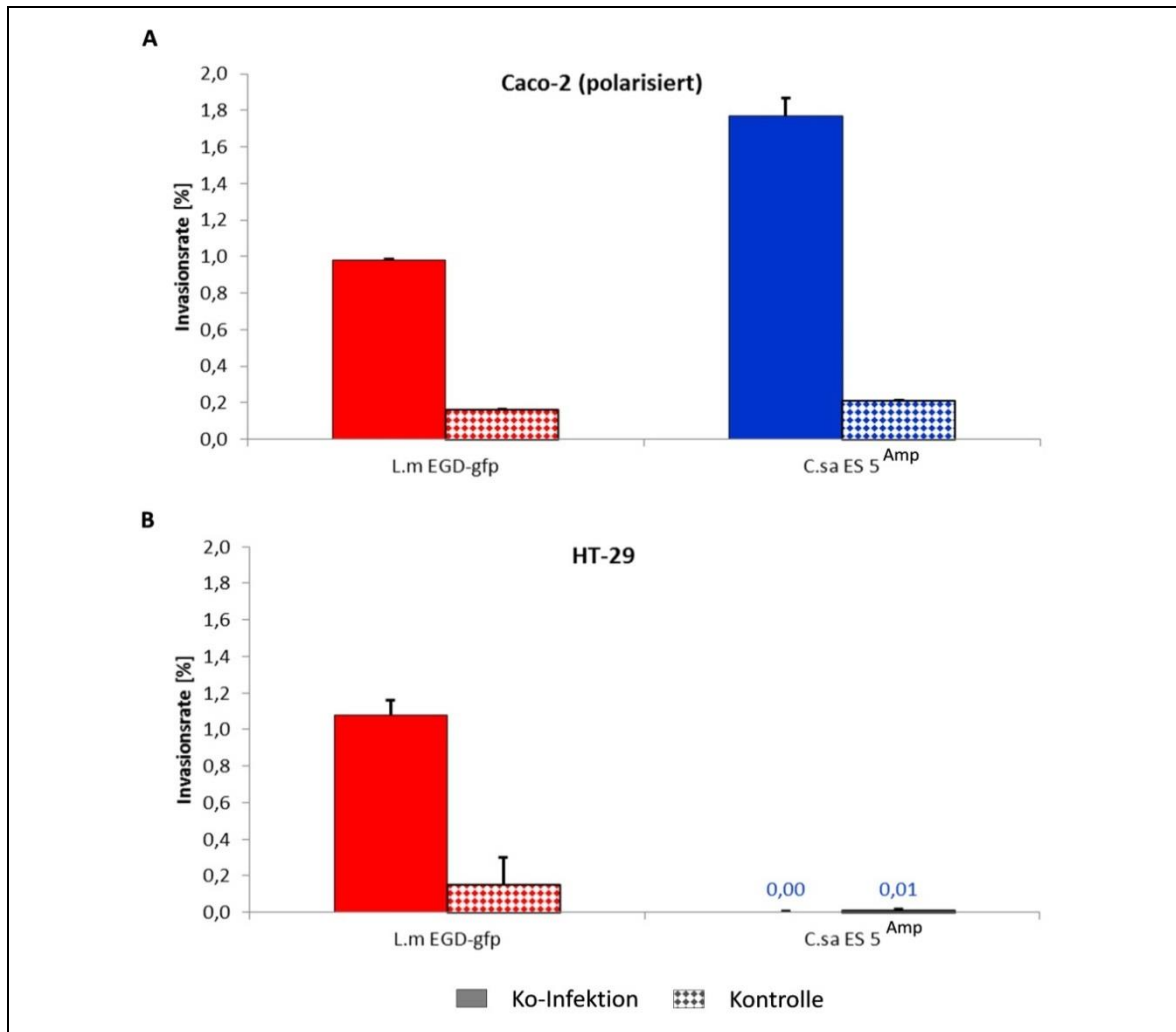


Abb. 29: Prozentuale Darstellung des Invasionsverhaltens von *C. sakazakii* ES 5^{Amp} und *L. monocytogenes* EGD-gfp in (A) Caco-2- und (B) HT-29-Zellen. Die Zellen wurden vor der Ko-Infektion mit *B. cereus* F837/76 für 5 Minuten vorinkubiert.

4.6. Untersuchung der antimikrobiellen Wirkung von Probiotika auf das Wachstum von *C. sakazakii* ES 5

Laut FAO/WHO (2007) sind Probiotika lebende Mikroorganismen, welche die Gesundheit fördern sollen, wenn sie in ausreichender Menge aufgenommen werden. Die antimikrobielle Wirkung von Probiotika auf Pathogene wurde bereits mehrfach gezeigt. Für *C. sakazakii* konnte jedoch die hemmende Wirkung der Probiotika auf das Wachstum und die Kolonisation dieses Pathogens bisher noch nicht eindeutig gezeigt werden. Daher wurde die antibakterielle Aktivität der drei ausgewählten probiotischen Stämme *L. casei*, *L. rhamnosus* und *L. helveticus* mittels des „spot on the lawn“ Verfahrens nach Jacobsen *et al.*, 1999 charakterisiert. Dazu wurde die Übernachtskultur der Probiotika auf eine OD₆₀₀ von 6,5 eingestellt und auf MRS-Medium für 24 h unter anaeroben Bedingungen bei 37 °C kultiviert. Anschließend wurden die Probiotika-Spots mit 1 % iger *C. sakazakii* ES 5-Kultur in BHI-Softagar (0,7 %) überschichtet. Nach Inkubation über Nacht wurde der

Hemmhof ausgemessen.

In Abb. 30 ist das Wachstum von *C. sakazakii* ES 5 bei einer Ko-Kultivierung mit probiotischen *Lactobacillus* (L.)-Stämmen auf MRS-Agar dargestellt. Die Tag-Kultur entspricht einem 2 % igen Inokulum der *C. sakazakii* ES 5-Übernachtskultur, das für zwei Stunden bei 37 °C inkubiert wurde, bevor die MRS-Agarplatten damit überschichtet wurden. Die Bakterien befanden sich somit in der logarithmischen Wachstumsphase. Vergleichend dazu wurde die *C. sakazakii* ES 5-Übernachtskultur direkt in den Assay eingesetzt. Als Kontrolle diente das bakteriozide Antibiotikum Ampicillin (100 mg/ml), von dem 7 µl auf ein Plättchen auf der Agaroberfläche aufgetragen wurde. Die phänotypische Auswertung ergibt eine deutliche Wachstumsinhibition von *C. sakazakii* ES 5 bei einer Ko-Kultivierung mit den *Lactobacillus*-Stämmen *L. casei*, *L. rhamnosus* und *L. helveticus*. Die Inhibition von *C. sakazakii* ES 5 aus der Tagkultur ist deutlich stärker als die der *C. sakazakii* ES 5-Übernachtskultur. Dies ist vermutlich auf den niedrigeren Bakterientiter in der Tagkultur zurückzuführen, welcher sich in der Dichte der Bakterienkolonien auf den Agarplatten äußert (Abb. 30).

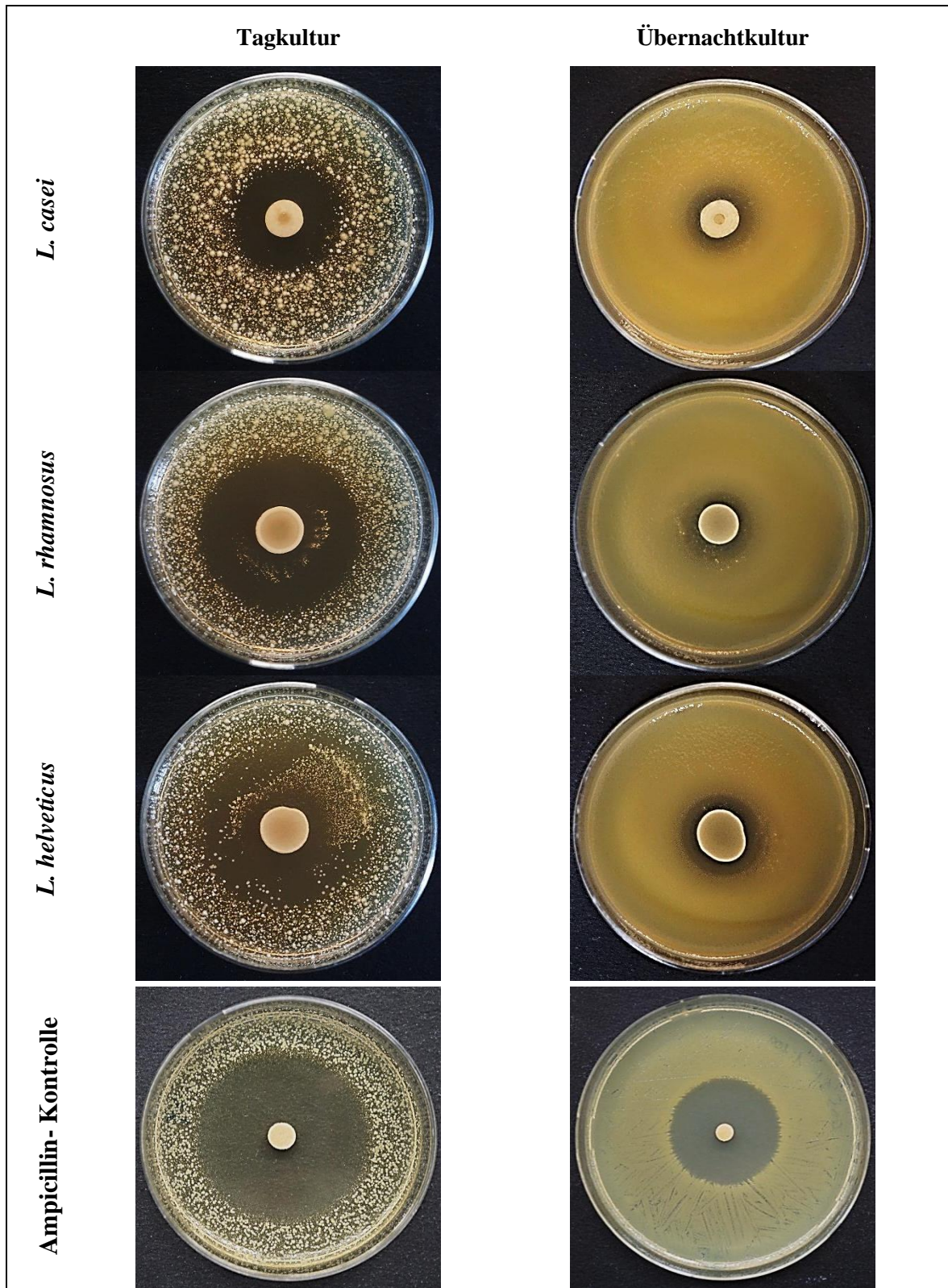


Abb. 30: Antibakterielle Aktivität von *L. casei*, *L. rhamnosus* und *L. helveticus* auf *C. sakazakii* ES 5. Die Probiotika wurden mit einer OD₆₀₀ von 6,5 auf MRS-Agar gespotet, für 24 h bei 37 °C anaerob bebrütet und mit einer *C. sakazakii* ES 5-Tagkultur bzw. Übernachtskultur überschichtet.

In der Abb. 31 sind die Durchmesser der Hemmhöfe graphisch dargestellt. Die stärkste Wachstumshemmung der *C. sakazakii* ES 5-Tagkultur ist mit 3,3 cm durch *L. rhamnosus* und *L. helveticus* zu beobachten und entspricht mit fast 94 % der Hemmhofgröße des

Kontrollansatzes mit Ampicillin (3,5 cm). Die Hemmung der *C. sakazakii* ES 5-Übernachtskultur durch probiotische *Lactobacillus*-Stämme ist, im Vergleich zur Tagkultur, deutlich niedriger und beträgt zwischen 1,3 cm und 1,5 cm im Vergleich zur Ampicillin-Kontrolle mit 2,2 cm. Der geringere Durchmesser des Hemmhofs von der *C. sakazakii*-Übernachtskultur ist auf den deutlich höheren Bakterientiter in der Übernachtskultur im Vergleich zur *C. sakazakii* ES 5-Tagkultur zurückzuführen. Somit gibt es eine Korrelation zwischen der antimikrobiellen Wirkung der *Lactobacillus*-Stämme und dem Bakterientiter der *C. sakazakii*-Kultur, die mit zunehmender Bakteriendichte abnimmt.

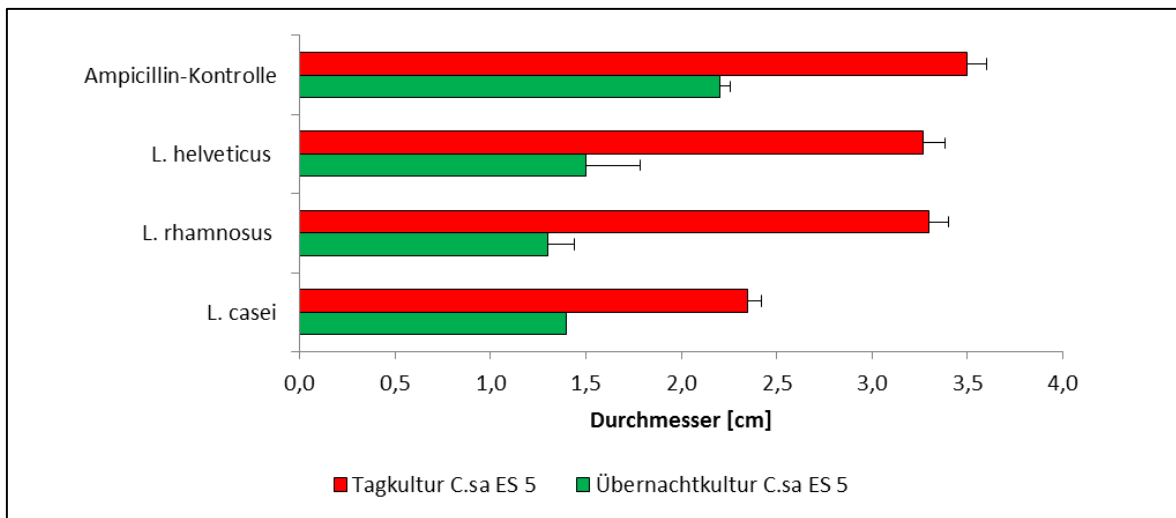


Abb. 31: Wachstums hemmung von *C. sakazakii* ES 5 durch Ko-Kultivierung mit *Lactobacillus*-Stämmen auf MRS-Medium im Vergleich zum Kontrollansatz mit Ampicillin.

Nachdem die antimikrobielle Wirkung von *L. casei*, *L. rhamnosus* und *L. helveticus* auf Festmedium nachgewiesen werden konnte, wurde im nächsten Schritt das Wachstum von *C. sakazakii* ES 5 in Anwesenheit von jeweils einem *Lactobacillus*-Stamm in RPMI-Medium über einen Zeitraum von 2,5 h analysiert. Dazu wurde zunächst aus der Übernachtskultur von *C. sakazakii* ES 5 ein 2 % iges Inokulum hergestellt und für zwei Stunden bei 37 °C unter Schütteln inkubiert, damit die Bakterien die logarithmische Wachstumsphase erreichen. Anschließend wurden *C. sakazakii* ES 5 und die probiotischen *Lactobacillus*-Stämme im Verhältnis 1:10 bei 37 °C und 7 % CO₂ im Zellkulturinkubator kultiviert.

In der Abb. 32 ist das Wachstumsverhalten von *C. sakazakii* ES 5 in Ko-Kultivierung mit probiotischen *Lactobacillus*-Stämmen in Form eines Kurvenverlaufs mit durchgehender Linie und mit gleichfarbig gestrichelter Linie das Wachstum der probiotischen *Lactobacillus*-Stämme ohne *C. sakazakii* ES 5 dargestellt. Zum Vergleich wurde ebenfalls das Wachstum von *C. sakazakii* ES 5 in RPMI-Medium (in Schwarz) dargestellt. Die

Abnahme der Zellzahl von *C. sakazakii* ES 5 bei gemeinsamer Kultivierung mit probiotischen *Lactobacillus*-Stämmen um zwei bis vier log-Stufen zeigt eine inhibitorische Wirkung der probiotischen *Lactobacillus*-Stämme auch in Flüssigmedium, trotz Umstellung auf andere Nährstoff- und Wachstumsbedingungen. Der Bakterientiter der probiotischen Kontrollansätze ohne *C. sakazakii* ES 5 bleibt über die gesamte Versuchsdauer auf konstantem Niveau, da entweder eine Anpassung des Stoffwechsels der *Lactobacillus*-Stämme in diesem Zeitraum nicht stattgefunden hat oder die Versuchsbedingungen im CO₂-Brutschrank nicht den optimalen Wachstumsbedingungen der Laktobazillen im Darm entsprechen. Die konstante CFU/ml der *Lactobacillus*-Stämme liefert zudem den Hinweis darauf, dass die inhibitorische Wirkung auf das *C. sakazakii* ES 5-Wachstum nicht auf der höheren Ausgangs-CFU der Laktobazillen beruht. Dies bedeutet, dass die Wachstumshemmung von *C. sakazakii* ES 5 nicht aufgrund des Nährstoffentzugs infolge des Wachstums der *Lactobacillus*-Stämme erfolgt, da sich diese in einer CFU-Zunahme der *Lactobacillus*-Stämme bei gleichzeitiger CFU-Abnahme von *C. sakazakii* ES 5 äußern würde. Eine konstante Zellzahl ist ebenfalls bei *C. sakazakii* ES 5 bis zum Zeitpunkt $t=1,5$ h zu erkennen, wenn dieser alleine in RPMI-Medium kultiviert wird. Ab diesem Zeitpunkt ist ein leichter Anstieg der Zellzahl zu beobachten, was auf eine Anpassung an neue Wachstumsbedingungen und evtl. Aktivierung alternativer Stoffwechselwege zurückzuführen ist.

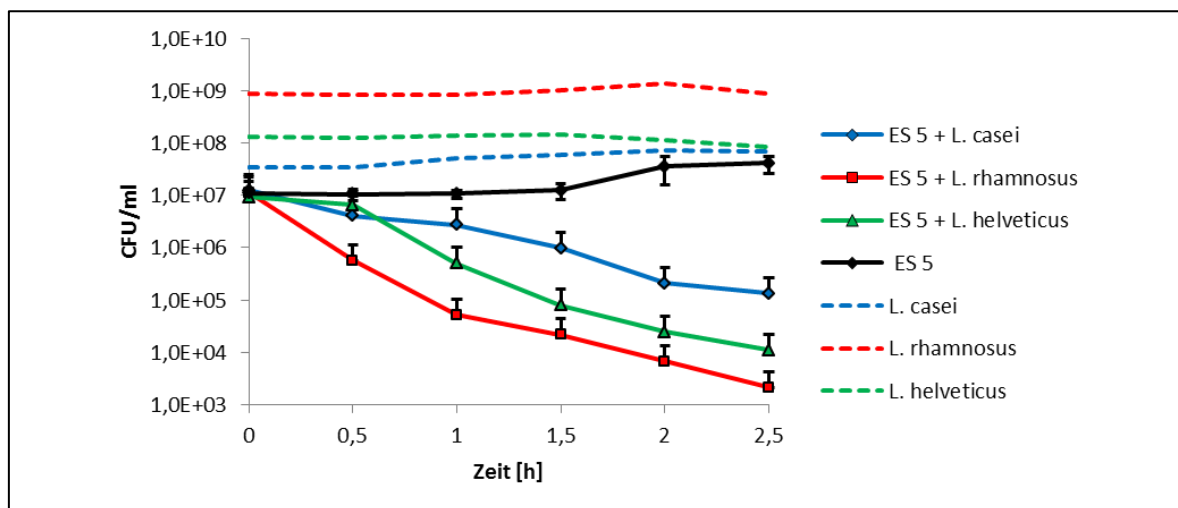


Abb. 32: Wachstum von *C. sakazakii* ES 5 in Ko-Kultivierung mit *Lactobacillus*-Stämmen. Die schwarze Linie stellt das Wachstum von *C. sakazakii* ES 5 ohne probiotische *Lactobacillus*-Stämme dar. Die Mittelwerte stammen aus drei unabhängigen Replikaten.

4.7. Einfluss von Probiotika auf die Kolonisation von *C. sakazakii* ES 5 in Caco-2- und HT-29-Zellen

Als natürliche Kommensalen besiedeln probiotische Keime von der Geburt an den Magen-

Darm-Trakt von Mensch und Tier und sind für die Aufrechterhaltung des Mikrobioms unerlässlich. Es wird vermutet, dass Probiotika als „Schutzschild“ auf der Oberfläche der Darmschleimhaut die Adhäsion von Pathogenen hemmen bzw. durch Aggregatbildung das Pathogen umschließen und so den Kontakt zur Wirtszelloberfläche blockieren. Zur Überprüfung der Aggregatbildung wurden *C. sakazakii* ES 5 und drei probiotische *Lactobacillus*-Stämme in PBS für zwei Stunden bei 37 °C ko-kultiviert und anschließend mikroskopisch untersucht. Dabei war die Aneinanderlagerung der einzelnen Bakterienzellen gut zu beobachten, jedoch konnte keine Ko-Aggregatbildung aus *C. sakazakii* ES 5 und Lactobazillen nachgewiesen werden.

Um festzustellen, ob die in dieser Arbeit verwendeten probiotischen Stämme die Kolonisation von *C. sakazakii* ES 5 hemmen, wurden ausdifferenzierte Caco-2-Zellen und HT-29-Zellen mit Probiotika (MOI=100) für zwei Stunden inkubiert und anschließend mit *C. sakazakii* ES 5 (MOI=10) infiziert. Zu den Zeitpunkten $t=30'$ (=Adhäsion) und $t=2,5$ h (=Invasion) nach Zugabe der Infektionslösung wurden die eukaryotischen Zellen lysiert und die Bakterien auf LB-Agar zur CFU-Bestimmung ausplattiert. Zum Vergleich wurde parallel ein Standard-Gentamcinassay mit *C. sakazakii* ES 5 in unbehandelten Darmepithelzellen durchgeführt. Die berechneten CFU-Werte wurden ins prozentuale Verhältnis zum Kontrollansatz gesetzt. Die 100 % steht somit für die Adhäsions-/Invasionsrate von *C. sakazakii* ES 5 in nicht vorbehandelten Caco-2- bzw. HT-29-Zellen (Abb. 33).

Die Adhäsionsraten von *C. sakazakii* ES 5 an mit probiotischen *Lactobacillus*-Stämmen vorinkubierten Caco-2- bzw. HT-29-Zellen sind deutlich höher als die an unbehandelten Zellen (entspricht 100 %), wobei die Adhäsionsraten bei HT-29-Zellen insgesamt niedriger als bei Caco-2-Zellen sind. Die Invasivität von *C. sakazakii* ES 5 ist hingegen in beiden Zelllinien deutlich niedriger als im jeweiligen Kontrollansatz. Die Invasionsraten in ausdifferenzierten Caco-2-Zellen liegen zwischen 0,6 % und 10,3 % und bei HT-29-Zellen zwischen 6,8 % und 20,3 %. Aus den gewonnenen Daten lässt sich schließen, dass keine Hemmung der Adhäsion von *C. sakazakii* ES 5 erfolgt, jedoch wird die Invasivität von *C. sakazakii* ES 5 durch die Vorinkubation der eukaryotischen Zellen mit probiotischen *Lactobacillus*-Stämmen deutlich vermindert.

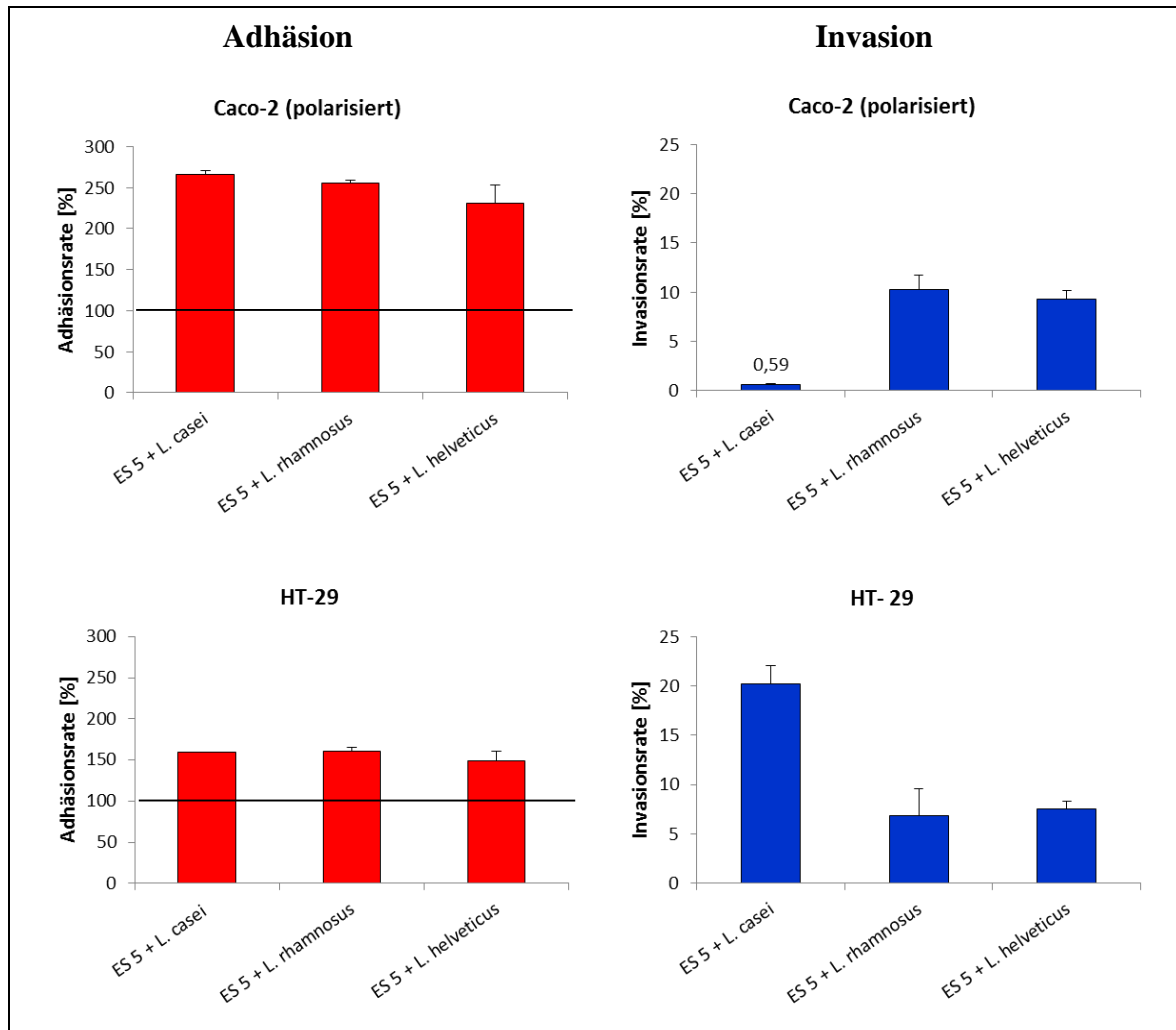


Abb. 33: Prozentuale Darstellung der Adhäsion und Invasion von *C. sakazakii* ES 5 in Caco-2- und HT-29-Zellen nach Vorinkubation mit *L. casei*, *L. rhamnosus* und *L. helveticus*. Die Werte sind ins prozentuale Verhältnis zum Kontrollansatz ohne Vorbehandlung mit Probiotika (=100 %, schwarze durchgezogene Linie) gesetzt.

Im Folgenden wurde der Einfluss einer Ko-Infektion auf die Kolonisation von *C. sakazakii* ES 5 untersucht, indem die ausdifferenzierten Caco-2- und HT-29-Zellen gleichzeitig mit *C. sakazakii* ES 5 und jeweils einem probiotischen *Lactobacillus*-Stamm infiziert wurden. Die CFU/ml-Werte für die Adhäsion wurden ins prozentuale Verhältnis zur Infektionslösung gesetzt, wohingegen sich die ermittelten Invasionsraten auf den Anteil an adhärenierten Bakterien beziehen. Im Gegensatz zur Adhäsion von *C. sakazakii* ES 5 an mit *Lactobacillus* vorinkubierten HT-29-Zellen, ist seine Adhäsion während einer Ko-Infektion mit *Lactobacillus*-Stämmen deutlich verringert, was ein Indiz für das Vorliegen einer kompetitiven Hemmung an der Wirtszelloberfläche ist. Die Invasivität von *C. sakazakii* ES 5 wird durch die Anwesenheit von *L. casei* und *L. rhamnosus* vollständig und von *L. helveticus* stark gehemmt (Abb. 34). Zum Vergleich wurde der Versuch unter den gleichen Bedingungen mit ausdifferenzierten Caco-2-Zellen durchgeführt. Im Gegensatz zur HT-29-Zelllinie sind die Adhäsion und Invasion von *C. sakazakii* ES 5 in

Caco-2-Zellen vollständig gehemmt. *C. sakazakii* ES 5 konnte in keinem der drei unabhängigen Versuche isoliert werden.

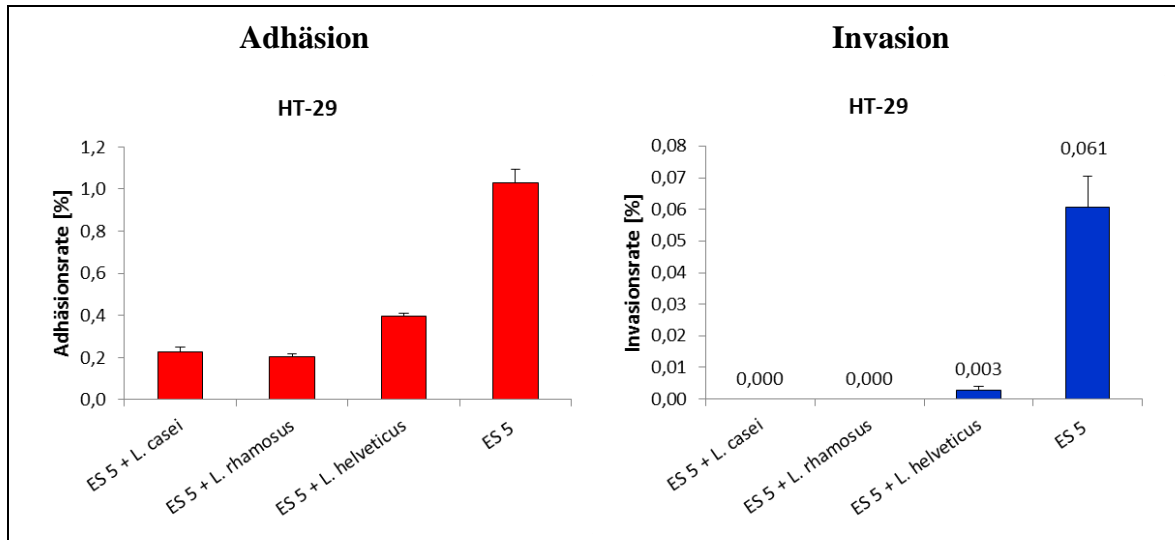


Abb. 34: Prozentuale Darstellung der Adhäsion und Invasion von *C. sakazakii* ES 5 in HT-29-Zellen.

4.8. Untersuchung der antimikrobiellen Wirkung von *Lactobacillus*-Stämmen auf die Kolonisationsfähigkeit von *C. sakazakii* ES 5

Basierend auf dem Ergebnis in Kapitel IV.4.6, in dem die antimikrobielle Wirkung der probiotischen Stämme *L. casei*, *L. rhamnosus* und *L. helveticus* auf das Wachstum von *C. sakazakii* ES 5 nachgewiesen werden konnte, wurde der Einfluss der zellfreien, sterilen Überstände dieser *Lactobacillus*-Stämme auf das Kolonisationsverhalten von *C. sakazakii* ES 5 im Zellkulturmodell an ausdifferenzierten Caco-2- und HT-29-Zellen untersucht. Dazu wurde der eukaryotische Zell-Monolayer vor der Infektion mit *C. sakazakii* ES 5 mit probiotischen Überständen vorinkubiert. Die Überstände wurden aus einer 24-stündigen Übernachtskultur in MRS-Medium mittels Zentrifugation gewonnen und sterilfiltriert, um vegetative Zellen zu entfernen. Anschließend wurde der Überstand im Verhältnis 1:5 in RPMI-Medium verdünnt, da die höheren Konzentrationen zur Zerstörung des Zell-Monolayers führen. Zur Infektion der Zellen wurde aus der *C. sakazakii* ES 5-Übernachtskultur ein 2 % iges Inokulum hergestellt und für zwei Stunden bei 37 °C inkubiert, sodass sich *C. sakazakii* ES 5 zum Zeitpunkt der Infektion in der logarithmischen Wachstumsphase befand. Zum Vergleich wurde ein Kontrollansatz mit *C. sakazakii* ES 5 in unbehandelten Caco-2-Zellen mitgeführt. Zusätzlich zu unbehandelten, sterilen Überständen von *Lactobacillus*-Stämmen, wurde ihre antimikrobielle Wirkung in Abhängigkeit des pH-Wertes und der Hitzestabilität überprüft, indem die probiotischen Überstände auf einen neutralen pH-Wert von 7 eingestellt bzw. bei 121 °C für 15 Minuten autoklaviert wurden.

Anhand des Adhäsions- und Invasionsverhaltens von *C. sakazakii* ES 5 konnten erste Erkenntnisse über die Hitzestabilität antimikrobieller Substanzen und die pH-Wert Abhängigkeit gezogen werden.

In der Abb. 35 sind die Adhäsions- und Invasionsraten von *C. sakazakii* ES 5 in Caco-2-Zellen dargestellt, die vor der Infektion mit nativen, hitzebehandelten oder neutralisierten (pH=7) Überständen von *Lactobacillus*-Stämmen vorbehandelt wurden. Die Adhäsionsrate ist ins prozentuale Verhältnis zur Infektionslösung gesetzt, die Invasionsrate stellt den Anteil an eingedrungenen Bakterien dar und wurde ins Verhältnis zu den adhären Bakterien gesetzt. Die Adhäsion von *C. sakazakii* ES 5 an Caco-2-Zellen, die mit probiotischen Überständen vorbehandelt wurden, ist mit 1,5 % bis 1,9 % im Vergleich zum Kontrollansatz mit 2,3 % nur geringfügig niedriger. Bei Caco-2-Zellen, die mit neutralisierten probiotischen Überständen vorbehandelt wurden, ist eine höhere Adhäsionsrate (2 % bis 2,6 %) festzustellen, was ein Indiz für die pH-Wert Abhängigkeit der antimikrobiellen Wirkung ist. Die Adhäsionsrate von *C. sakazakii* ES 5 bei Caco-2-Zellen, die zuvor mit hitzebehandelten Überständen vorinkubiert wurden, ist mit 1,5 % bei *L. helveticus* niedriger und mit 2,2 % bei *L. casei* gleich hoch wie im Kontrollansatz (2,3 %). Die invasionshemmende Wirkung probiotischer Überstände wird bei Betrachtung der Invasionsraten ebenfalls deutlich: Aus Caco-2-Zellen, die mit probiotischen Überständen mit einem pH-Wert von 3-4 vorinkubiert wurden, konnte kein *C. sakazakii* ES 5 reisoliert werden, sodass die Invasion von *C. sakazakii* ES 5 vollständig gehemmt wurde. Bei Caco-2-Zellen, die mit hitzebehandelten *Lactobacillus*-Überständen vorinkubiert wurden, findet ebenfalls keine Invasion in die eukaryotische Zelle statt bzw. die Invasivität ist deutlich vermindert (*L. rhamnosus* 0,014 %), was auf die Hitzestabilität der antimikrobiellen Komponenten schließen lässt. Die Invasion in Caco-2-Zellen, die zuvor mit neutralisierten Überständen (pH-Wert= 7) vorbehandelt wurden, ist mit 9,9 % bis 10,8 % zwar deutlich niedriger im Vergleich zum Kontrollansatz (19 %), jedoch ist die Hemmung der Invasion wesentlich geringer als in den beiden anderen Ansätzen mit unbehandelten (pH= 3-4) und hitzebehandelten Überständen (Abb. 35).

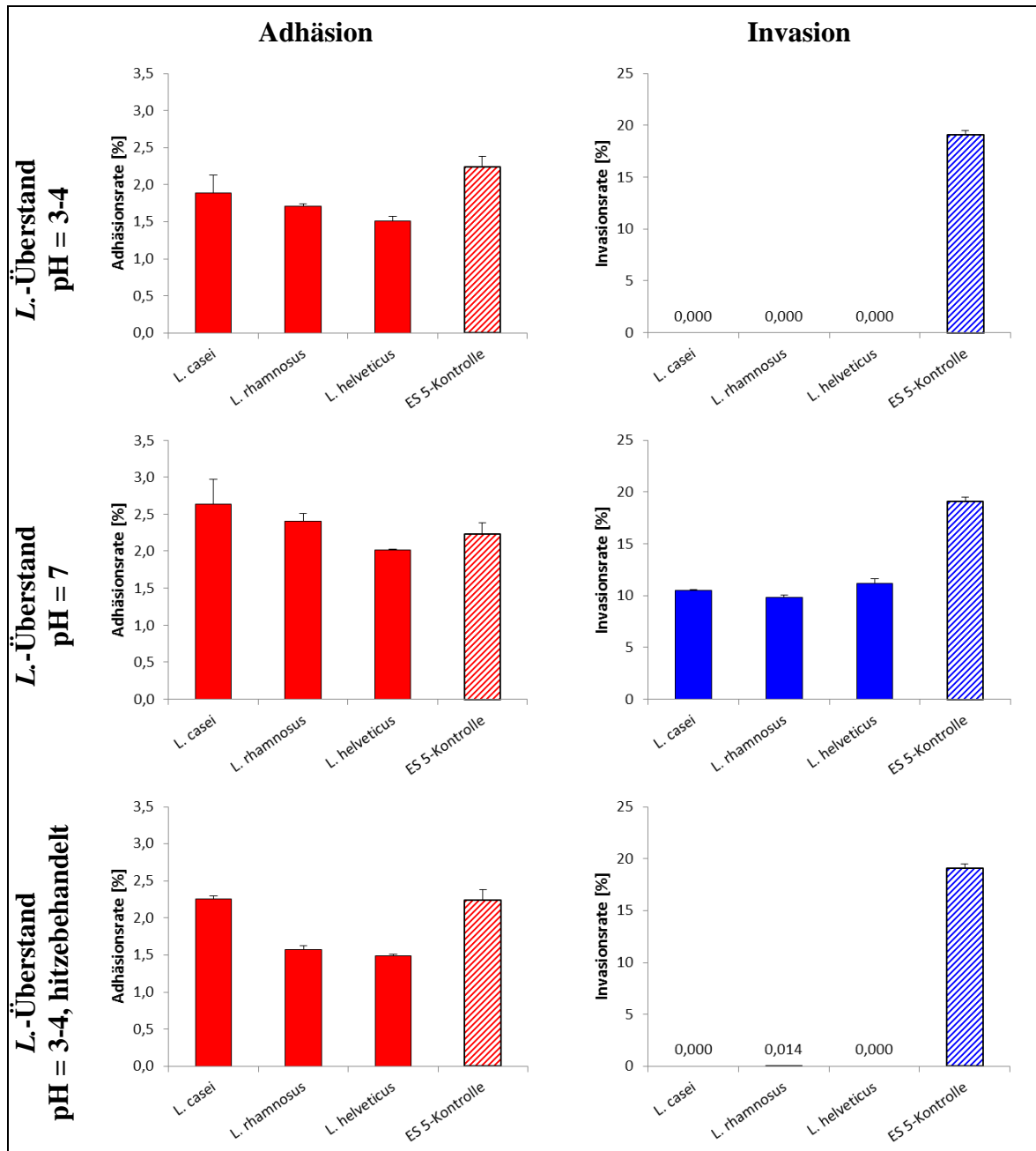


Abb. 35: Prozentuale Darstellung des Adhäsions- und Invasionsverhaltens von *C. sakazakii* ES 5 in ausdifferenzierten Caco-2-Zellen. Die Zellen wurden mit antimikrobiell wirkenden Überständen von *L. casei*, *L. rhamnosus* und *L. helveticus* vorbehandelt.

Darüber hinaus wurde die antimikrobielle Wirkung der probiotischen *Lactobacillus*-Überstände auf das Kolonisationsverhalten von *C. sakazakii* ES 5 in einer weiteren Darmepithelzelllinie, den Mukus produzierenden HT-29-Zellen untersucht. Verglichen mit der Adhäsion an den Caco-2-Zellen ist die Adhäsion von *C. sakazakii* ES 5 an HT-29-Zellen insgesamt etwas höher (Abb. 36). Die Adhäsionsrate an HT-29-Zellen, die mit neutralisiertem (pH=7) probiotischem Überstand behandelt wurden, ist im Vergleich zu den anderen Ansätzen auch bei dieser Zelllinie am höchsten.

Die Invasion von *C. sakazakii* ES 5 in HT-29-Zellen ist in allen drei Ansätzen deutlich

gehemmt. Die stärkste Hemmung ist bei HT-29-Zellen zu erkennen, die mit unbehandeltem Überstand (pH=3-4) vorinkubiert wurden. Hier betragen die Invasionsraten je nach probiotischem Überstand zwischen 0,008 % und 0,03 % und sind somit um mehr als die Hälfte verringert im Vergleich zum Kontrollansatz (0,08 %). Mit Ausnahme des probiotischen Stamms *L. casei* ist die Hemmung, wie auch bei den Caco-2-Zellen, bei *Lactobacillus*-Überständen, deren pH-Wert auf sieben eingestellt wurde, am geringsten. Die Invasionsraten betragen dabei zwischen 0,03 % und 0,04 %. Somit kann auch für diese Zelllinie der Einfluss des pH-Werts auf die antimikrobielle Wirkung bestätigt werden. Die Invasion von *C. sakazakii* ES 5 in HT-29-Zellen, die mit hitzebehandelten Überständen vorbehandelt wurden, ist im Gegensatz zu der in Caco-2-Zellen höher und beträgt zwischen 0,02 % und 0,05 % je nach probiotischem *Lactobacillus*-Überstand (Abb. 36).

Somit lässt sich feststellen, dass zellfreie Überstände von probiotischen *Lactobacillus*-Stämmen ebenfalls einen Einfluss auf die Adhäsion und Invasion von *C. sakazakii* ES 5 haben. Im Gegensatz zur Vorinkubation der eukaryotischen Zellen mit probiotischen *Lactobacillus*-Stämmen, bewirkt die Vorbehandlung mit sterilen, probiotischen *Lactobacillus*-Überständen eine Verminderung, jedoch keine vollständige Hemmung der Adhäsion von *C. sakazakii* ES 5. Außerdem ist die antimikrobielle Wirkung der Überstände abhängig vom pH-Wert, sowohl in Bezug auf die Adhäsion als auch auf die Invasion. Da die Hitzebehandlung keinen negativen Effekt auf die inhibitorische Wirkung der probiotischen *Lactobacillus*-Überstände bei Adhäsion und Invasion zeigt, scheinen die antimikrobiellen Substanzen im Überstand hitzestabil zu sein.

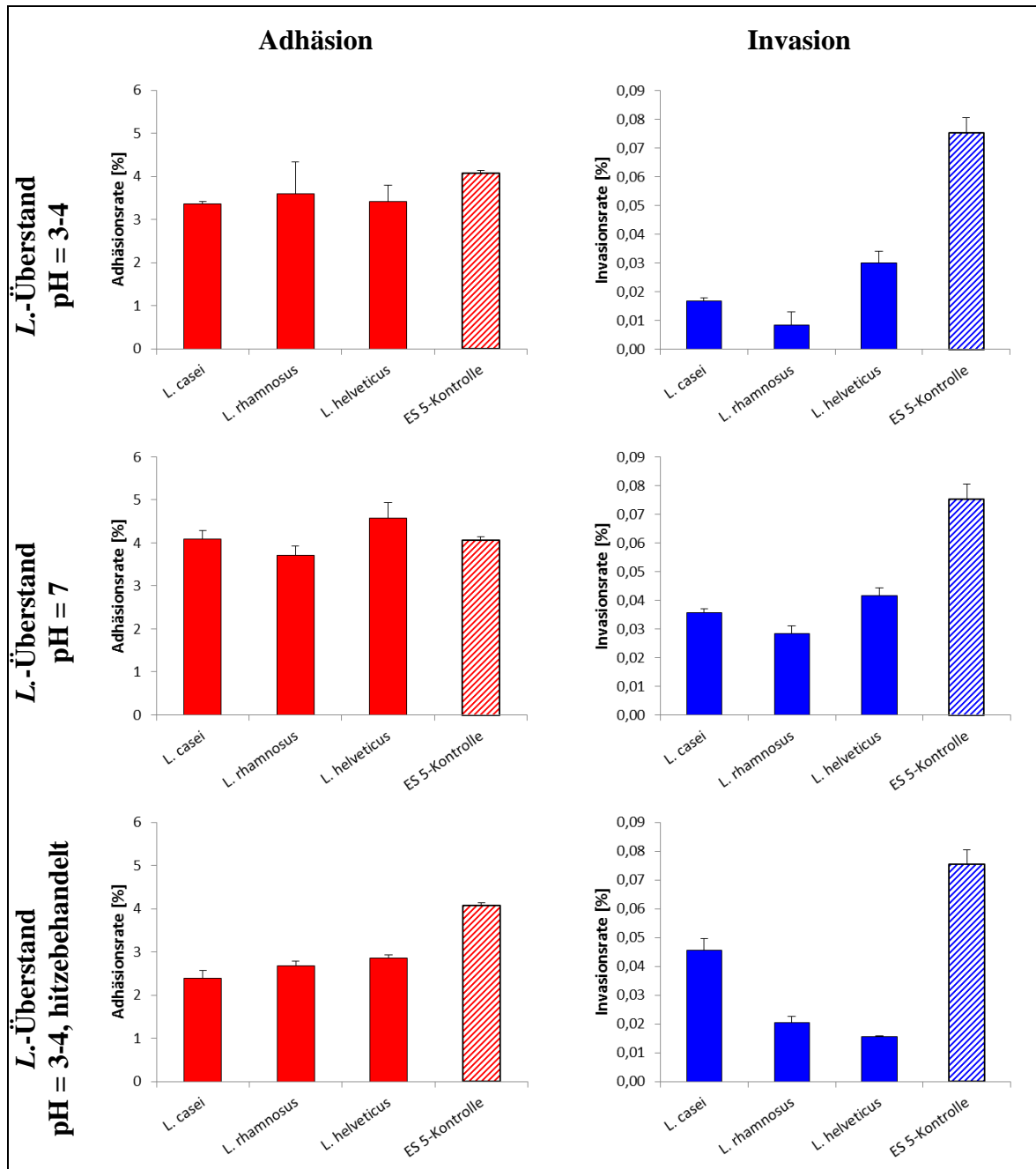


Abb. 36: Prozentuale Darstellung des Adhäsions- und Invasionsverhaltens von *C. sakazakii* ES 5 in HT-29-Zellen. Die Zellen wurden mit antimikrobiell wirkenden Überständen von *L. casei*, *L. rhamnosus* und *L. helveticus* vorbehandelt.

4.9. Wachstum von *C. sakazakii* ES 5 in Säuglingsnahrung auf Milchpulverbasis (PIF) unter Zugabe steriler Überstände von probiotischen *Lactobacillus*-Stämmen

Nachdem die Hitzestabilität der probiotischen antimikrobiellen Substanzen in Kapitel IV.4.8 gezeigt werden konnte, wurde im Hinblick auf ihre prophylaktische Wirkung der Einfluss von probiotischen Überständen auf das Wachstum von *C. sakazakii* ES 5 in pulverförmiger Säuglingsnahrung untersucht. Durch den Einsatz hitzebehandelter, steriler Überstände von probiotischen *Lactobacillus*-Stämmen in der Säuglingsnahrung, sollten

neue Präventionsmaßnahmen etabliert werden. Dazu wurden verschiedene handelsübliche Anfangs- und Folgemilchprodukte sowie Breinahrung auf pflanzlicher Basis aus den lokalen Drogeriemärkten zunächst mikrobiologisch nach ISO-Standard (ISO 22964:2017) in dem eigenen Diagnostiklabor des Lehrstuhls untersucht. Eine Kontamination mit *C. sakazakii* konnte in keinem Produkt nachgewiesen werden. Die Rekonstitution der Pulver erfolgte unter sterilen Bedingungen in BPW. Anschließend wurden die hitzebehandelten, sterilen Überständen der probiotischen Stämme *L. casei*, *L. rhamnosus* und *L. helveticus* im Verhältnis 1:5 (Gesamtvolumen 10 ml) zugegeben und die Proben mit einer *C. sakazakii* ES 5 CFU/g PIF gespikt. Parallel dazu wurde zu jedem untersuchten Nahrungsmittel ein Kontrollansatz mitgeführt, in der der probiotische Überstand durch steriles MRS-Medium ersetzt wurde. Entsprechend dem ISO-Standard (ISO 22964:2017) wurden nach 20 stündiger Inkubation bei 37 °C die Proben auf Selektivnährboden (CCI-Agar) ausplattiert und nach weiteren 24 h bei 37 °C die CFU/ml bestimmt.

In der Abb. 37 ist das Wachstum von *C. sakazakii* ES 5 in Anfangs- und Folgemilch sowie Brei nach 20 h Inkubation bei 37 °C dargestellt. Die ermittelten CFU-Werte wurden ins prozentuale Verhältnis zum Kontrollansatz gesetzt. Somit entsprechen 100 % dem Wachstum von *C. sakazakii* ES 5 in der Kindernahrung ohne Zugabe probiotischer Überstände. Es ist deutlich zu erkennen, dass durch alle probiotischen *Lactobacillus*-Überstände bei allen drei Nahrungstypen eine deutliche Wachstumsinhibition von *C. sakazakii* ES 5 stattgefunden hat. Es ist jedoch kein Unterschied in der Hemmung zwischen Anfangs- und Folgemilch festzustellen. Das Wachstum von *C. sakazakii* ES 5 ist im Brei trotz Zugabe von probiotischen Überständen am stärksten und liegt je nach probiotischem *Lactobacillus*-Überstand zwischen 37 % und 60 % im Vergleich zum Kontrollansatz (=100 %). Da Pflanzen ein natürliches Reservoir von *Cronobacter* spp. sind, könnten die pflanzlichen Inhaltsstoffe des Breis das bakterielle Wachstum fördern.

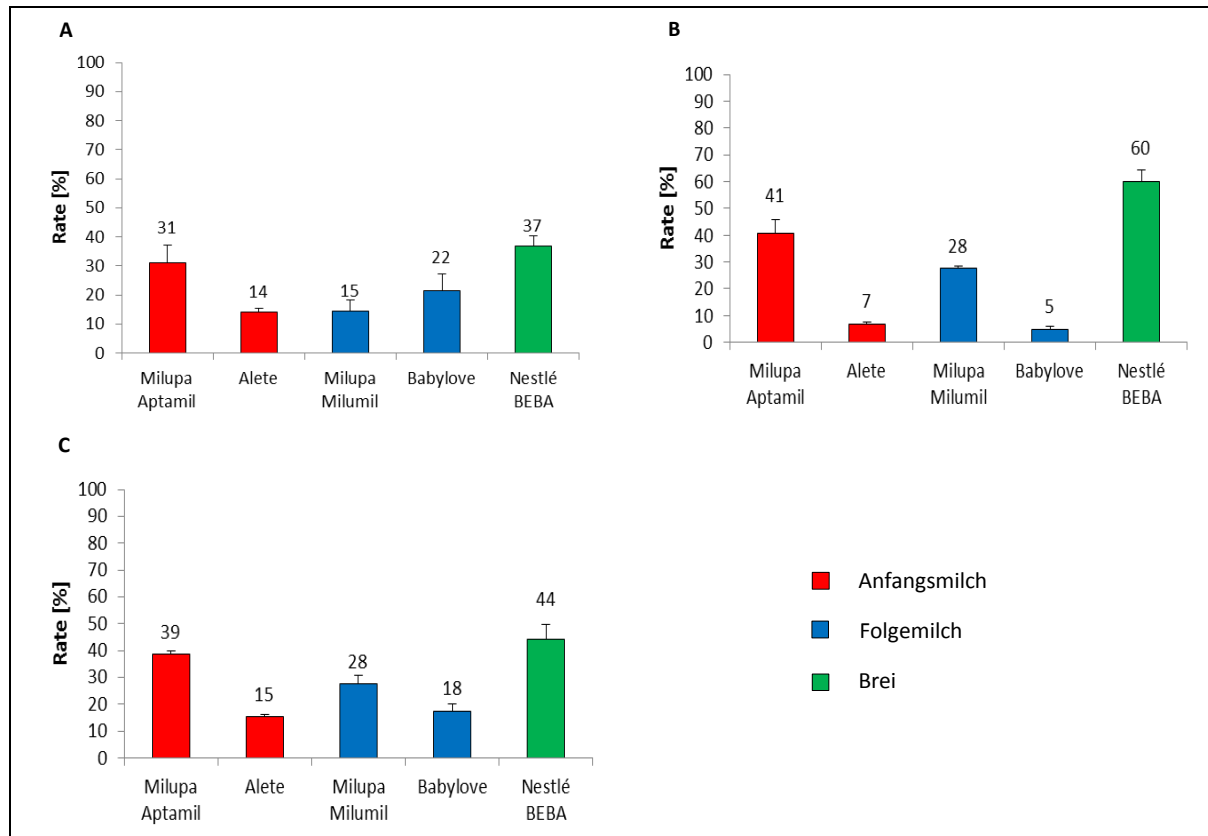


Abb. 37: Wachstum von *C. sakazakii* ES 5 in PIF mit Zusatz von probiotischem Überstand von (A) *L. casei*, (B) *L. rhamnosus* und (C) *L. helveticus* nach 20 h Inkubation bei 37 °C.

Somit lässt sich feststellen, dass das Wachstum von *C. sakazakii* ES 5 in PIF durch Zugabe der sterilen probiotischen *Lactobacillus*-Überstände gehemmt wird. Allerdings gibt es bezüglich des hemmenden Effekts starke Schwankungen bezüglich des Herstellers, des Nahrungstypen und des jeweiligen probiotischen *Lactobacillus*-Überstands.

V. DISKUSSION

1. Bedeutung der Biofilmbildung für die Pathogenität von *C. sakazakii*

Die Fähigkeit, Biofilm zu bilden, trägt entscheidend zum Überleben von *C. sakazakii* sowohl in der Umwelt als auch im Wirtsorganismus bei. Biofilm ist ein Zusammenschluss von Bakterienzellen, welche, umgeben von einer selbst produzierten, hydratisierten, Polysaccharid haltigen Matrix, an abiotischen und biotischen Oberflächen haften (Lehner *et al.*, 2005). Als physikalische Barriere dient er dem Schutz vor äußeren Umwelteinflüssen, wie z.B. osmotischem Stress, Hitze, antimikrobiellen Substanzen sowie dem Immunsystem des Wirtsorganismus (Costerton *et al.*, 1995, O'Toole *et al.*, 2000). Um den Einfluss verschiedener Umweltfaktoren und Nährstoffsituationen auf die Biofilmbildung von *C. sakazakii* zu untersuchen und zu klären, ob eine Korrelation zwischen der Biofilmbildung und der Virulenz besteht, wurde anhand verschiedener Wachstumsbedingungen ein standardisiertes Modell zur Biofilmbildung etabliert und die Virulenz der Bakterienzellen aus dem Biofilm im Zellkulturmodell untersucht. Dazu wurden vorab insgesamt 20 Stämme aus der Stammsammlung des Lehrstuhls für Hygiene und Technologie der Milch der Ludwig-Maximilians-Universität München ausgewählt. Dabei handelte es sich um 11 Umweltisolate, die aus Säuglingsnahrung isoliert wurden, 8 klinische Isolate und dem *C. sakazakii*-Stamm 21122, dessen Herkunft unbekannt ist.

1.1. Biofilm – interaktive Lebensweise von Bakterien in der Umwelt

Aufgrund seiner protektiven Eigenschaften erhöht Biofilm deutlich die Tenazität von *C. sakazakii* in der Umwelt. Diese Eigenschaft stellt insbesondere für die Lebensmittelindustrie eine große Herausforderung dar, da Biofilme als Quelle mikrobieller Kontamination, eine Gefahr für die Lebensmittelhygiene sind und somit ein gesundheitliches Risiko für die Konsumenten darstellen (Lehner *et al.*, 2005, Hartmann *et al.*, 2010, Costerton *et al.*, 1987). So tragen Biofilme auf der Oberfläche von Gerätschaften, die zur Herstellung oder Rekonstitution von pulverförmiger Säuglingsnahrung (*powdered infant formula*, PIF) dienen, zu *Cronobacter*-Ausbrüchen bei, die bei Säuglingen schwerwiegende Erkrankungen hervorrufen (Kim *et al.*, 2006).

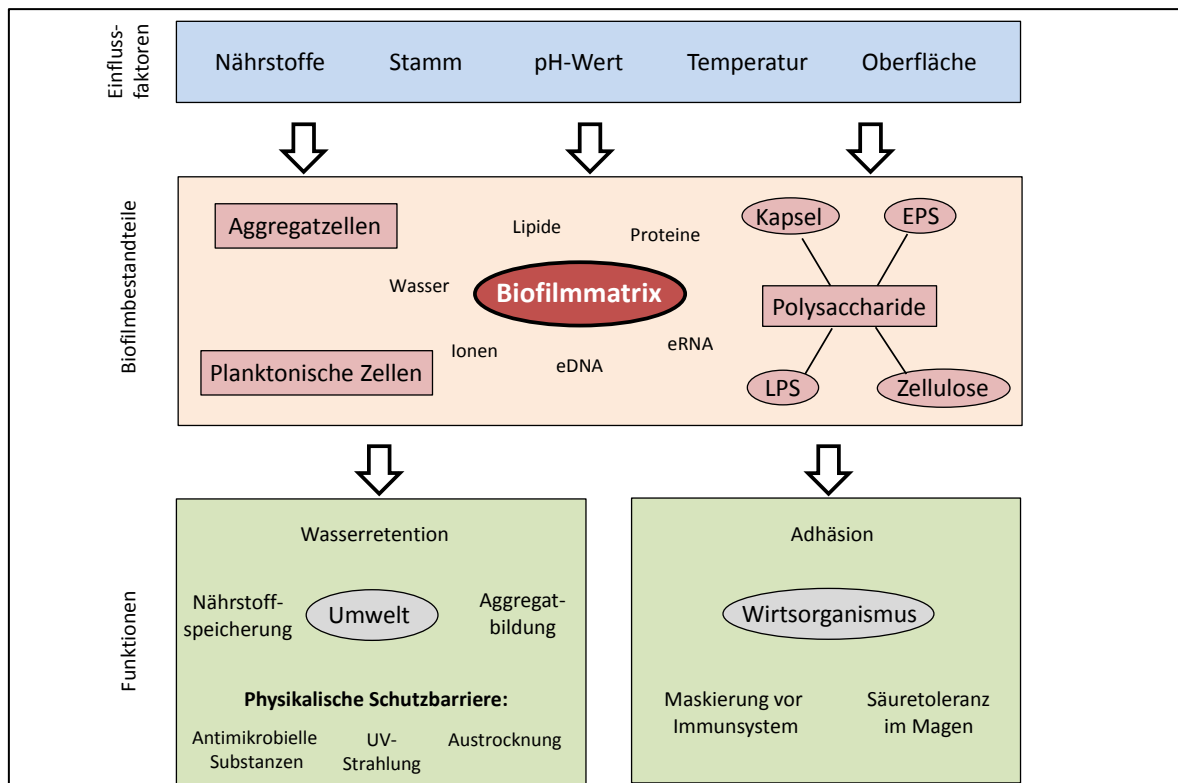


Abb. 38: Schematische Darstellung der Einflussfaktoren, Bestandteile und Funktionen des Biofilms bei *Cronobacter* spp.

Die Produktion von Biofilm wird durch zahlreiche äußere Einflüsse wie dem Medium, der Temperatur, dem Nährstoffangebot und der Oberflächenstruktur beeinflusst (Meireles *et al.*, 2015, Kim *et al.*, 2006), welche in dieser Arbeit untersucht wurden. Biofilm besteht aus einer gelartigen, hydratisierten Matrix, welche neben den Aggregatzellen und den planktonischen Zellen ein breites Spektrum an sezernierten Polysacchariden, Proteinen, Lipiden, extrazellulärer DNA (eDNA) und eRNA sowie Ionen beinhaltet und dem Biofilmgerüst seine dreidimensionale Struktur verleiht (Flemming and Wingender, 2010). Die Faktoren, welche die Biofilmbildung beeinflussen, sowie die Hauptbestandteile der Biofilmmatrix und die vielfältigen Funktionen des Biofilms in der Umwelt und im Wirt sind schematisch in Abb. 38 dargestellt.

Zur phänotypischen Biofilmcharakterisierung wurden insgesamt 20 *C. sakazakii*-Stämme auf verschiedenen Nährböden, die sich hinsichtlich ihrer Nährstoffzusammensetzung und ihrem Nährstoffgehalt unterschieden, bei unterschiedlichen Temperaturen kultiviert. Ziel war es, den Einfluss unterschiedlicher Kohlenstoffquellen und Wachstumsbedingungen auf die Fähigkeit der verschiedenen Stämme, Biofilm zu produzieren, zu untersuchen. Als nährstoffreiches Medium diente Milch-Agar, der aus steriler, trinkfertiger Säuglingsanfangsnahrung hergestellt wurde, einen hohen Kohlenhydratanteil aufweist und darüber hinaus die Kapselbildung bei *C. sakazakii* forciert (Caubilla-Barron *et al.*, 2007).

Die Kultivierung unter nährstoffarmen Bedingungen erfolgte auf Minimalmedium-Agar, dem als einzige Kohlenstoffquelle Maltose (0,4 %) zugesetzt wurde. Luria-Bertani-Agar, der außer Hefeextrakt auch Tryptose als Kohlenstoffquelle beinhaltet, wies im Vergleich zu den beiden anderen Medien einen intermediären Substratgehalt auf. Die unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen, 37 °C und Raumtemperatur, dienten der *in vivo* Simulation der Situation im Wirtsorganismus (37 °C) bzw. in der Umwelt (Raumtemperatur). Das Ergebnis der phänotypischen Biofilmanalyse konnte Aufschluss darüber geben, dass die Biofilmbildung individuell von dem jeweiligen Stamm, dem Medium und der Temperatur abhängig ist. Die unterschiedlich starke Ausprägung der Biofilmbildung auf den verschiedenen Nährböden gibt Hinweise darauf, dass eine Korrelation zwischen der Kohlenstoffquelle und der Fähigkeit zur Biofilmbildung bei den untersuchten *C. sakazakii*-Stämmen besteht. Die deutlichste Biofilmbildung konnte auf Milch-Agar nachgewiesen werden, da der Großteil der Stämme zum Teil stark glänzende Koloniemorphologien aufwies, deren Konturen nicht mehr klar voneinander abgrenzbar waren. Diese teilweise hochgradig muköse Koloniemorphologie auf Milch-Agar wurde auch von Caubilla-Barron *et al.* (2007) im Zusammenhang mit der Kapselbildung bei *C. sakazakii* beschrieben. Ebenfalls glänzende Kolonien konnten bei biofilmbildenden Stämmen auf Minimalmedium-Agar beobachtet werden, wohingegen auf LB-Agar die Biofilmbildung phänotypisch am schwächsten ausgeprägt war. Die uneinheitlichen Ergebnisse verschiedener Studien zum Einfluss unterschiedlicher Nährstoffquellen auf die Biofilmbildungskapazität von *C. sakazakii* verdeutlichen, dass die Biofilmproduktion innerhalb der Spezies *C. sakazakii* große Unterschiede aufweist. Während Jung *et al.* berichteten, dass Kohlenstoffe, insbesondere Succrose einen positiven Effekt auf die Biofilmbildung haben, identifizierten Dancer *et al.* Nitrat als wichtigste Determinante (Dancer *et al.*, 2009, Jung *et al.*, 2013). Die Tatsache, dass die Biofilmbildung bei Raumtemperatur nach Beendigung der 72-stündigen Inkubationszeit qualitativ gleich stark ausgeprägt wie bei 37 °C, ist ein Indiz dafür, dass die Biofilmbildung nicht nur im Wirtsorganismus von Bedeutung ist, sondern auch in der Umwelt eine wichtige Rolle spielt (Costerton *et al.*, 1995, O'Toole *et al.*, 2000). Das Ergebnis von Studien zur Kolonisationsfähigkeit von Biofilmmutanten an Caco-2-Zellen zeigt, dass die Adhäsion an die Wirtszelle im Vergleich zum Wildtyp vermindert ist (Hartmann *et al.*, 2010). Zusätzlich belegen Daten von Dr. K. Schauer (unpubliziert), dass die Deletion des *wzx*-Gens bei den Mutanten zu einer Attenuation der Proliferation in Makophagen (RAW-264.7) führt. Diese Feststellungen unterstützen somit die Hypothese, dass die

Biofilmbildung eine Rolle bei der Kolonisation der Wirtszelle spielt.

Unabhängig vom Medium und der Temperatur konnten auch in dieser Arbeit bei den 20 untersuchten *C. sakazakii*-Stämmen große stammspezifische Unterschiede in der Fähigkeit, Biofilm zu produzieren, festgestellt werden. Während einige Stämme, wie z.B. *C. sakazakii* 21029, insbesondere auf Milch-Agar hochgradig muköse Kolonien bildeten, wurden Stämme, wie z.B. *C. sakazakii* ES 5, aufgrund ihrer nicht mukösen, trockenen bis leicht glänzenden Oberfläche als gering bis nicht biofilmbildend charakterisiert (Abb. 3). Unter Berücksichtigung der Herkunft wurde ein Zusammenhang zwischen der Fähigkeit, Biofilm zu bilden, und der Isolierungsquelle der Stämme festgestellt. Insgesamt besaßen auf Milch- und Minimalmedium-Agar deutlich mehr Umweltisolate als klinische Isolate die Eigenschaft, Biofilm zu produzieren. So betrug der Anteil an biofilmbildenden Umweltisolaten 91 % auf Milchagar und 82 % auf Minimalmedium. Im Vergleich dazu war der Anteil an biofilmbildenden, klinischen Isolaten mit jeweils 50 % deutlich niedriger. Auf LB-Medium hingegen war der Anteil an biofilmbildenden Umweltisolaten (55 %) deutlich geringer als der Anteil an biofilmbildenden klinischen Isolaten (75 %). Eine deutliche Korrelation zwischen der Herkunft der Stämme und ihrer Fähigkeit, Biofilm zu produzieren, konnte auch bei der Biofilmquantifizierung mittels Kristall-Violett-Färbung nach Anzucht in flüssigem Minimalmedium festgestellt werden (Abb. 11 und Abb. 12). Insgesamt wurden 91 % der Umweltisolate als moderat (45 %) bis stark (46 %) biofilmbildend eingestuft, wohingegen die Mehrheit der klinischen Isolate (63 %) als schwach biofilmbildend bewertet wurde. Untersuchungen von Lehner *et al.* zur Biofilmbildung in verschiedenen Flüssigmedien von insgesamt 56 *C. sakazakii*-Isolaten kamen zu dem Ergebnis, dass es keine signifikanten Unterschiede in der Biofilmbildung zwischen klinischen Isolaten und Umweltisolaten gibt, jedoch war die EPS-Produktion von Umweltisolaten bei Kultivierung in M9-Medium mit Zusatz von Glukose im Vergleich zu klinischen Stämmen höher (Lehner *et al.*, 2005). Die große Variabilität innerhalb der Spezies *C. sakazakii* unter verschiedenen Umweltbedingungen Biofilm zu produzieren, zeigt, dass die Biofilmbildung ein komplexer multifaktorieller Prozess ist und bestätigt die Hypothese, dass dieser zeitlich strukturierte Prozess von äußeren Umweltfaktoren beeinflusst wird und stammspezifische Unterschiede aufweist (Iversen *et al.*, 2004b, Lehner *et al.*, 2005).

Basierend auf den Ergebnissen zur Analyse der Biofilmbildung verschiedener *C. sakazakii*-Stämme auf Festmedien wurden insgesamt drei Stämme ausgewählt, die sich in ihrer Fähigkeit, Biofilm zu produzieren, phänotypisch unterscheiden: Der *C. sakazakii*-

Stamm ES 5, der auf Festmedium eine nur leicht glänzende Koloniemorphologie zeigte und daher als gering biofilmbildend eingestuft wurde, der *C. sakazakii*-Stamm 21122, dessen Kolonien eine glänzende Oberfläche aufwiesen und der *C. sakazakii*-Stamm 21029, der aufgrund seiner mukösen, glänzenden Oberfläche und der nicht mehr abgrenzbaren Koloniekonturen als stark biofilmbildend charakterisiert wurde. Als Kontrollen wurden zusätzlich die von Dr. K. Schauer konstruierten *wzx*-Deletionsmutanten verwendet, deren *wzx*-Gen, welches das Transportenzym Flippase kodiert, fehlt. Ziel war es, die Rolle verschiedener zellgebundener (Kapsel, LPS) und nicht zellgebundener (EPS, Zellulose, Kolansäure) Polysaccharide im Biofilm anhand zielgerichteter Deletion des *wzx*-Gens zu charakterisieren, indem der Transport aktivierter Zucker blockiert wird. Diese Zucker fungieren als Bausteine der sogenannten „*repeating units*“, d.h. Zucker-Untereinheiten, aus denen sich die O-spezifische Seitenkette zusammensetzt (Samuel *et al.*, 2003). Die Deletion hat zur Folge, dass die Lipopolysaccharide (LPS) aufgrund der fehlenden O-spezifischen Seitenkette unvollständig sind.

Die Synthese der heteropolymeren O-Antigenstruktur erfolgt durch einen *wzx/wzy*-abhängigen Syntheseweg, der zugleich für die Biosynthese und den Transport von Exopolysacchariden (EPS) von Bedeutung ist (Whitfield, 2006, Islam *et al.*, 2014). Die LPS-Synthese beginnt mit der Bindung der O-Antigen *repeating units* an das Transportmolekül Undecaprenyl-Pyrophosphat (UndPP)-Lipid, an deren Zusammenbau zahlreiche Glycosyltransferasen beteiligt sind. Im nächsten Schritt katalysiert die Wzx-Flippase, welche bei den in dieser Arbeit verwendeten *wzx*-Mutanten fehlt, den Transport der an UndPP gebundenen O-Antigen-Untereinheiten aus dem Zytosol in den periplasmatischen Raum. An dem membranständigen Wzy-Protein werden die einzelnen *repeating units* zu der O-spezifischen Seitenkette polymerisiert. Die Länge der O-spezifischen Polysaccharidkette wird von Wzz kontrolliert und reguliert. Handelt es sich um die LPS-Synthese, so wird die Polysaccharidkette an Lipid A gebunden und an die äußere Membran angebracht. EPS wird ins Außenmilieu sezerniert oder an der äußeren Membran gebunden (Whitfield, 1995). Da dieser Biosyntheseweg sowohl an der LPS- als auch an der EPS-Produktion beteiligt ist, betrifft die *wzx*-Deletion nicht nur die vollständige LPS-Struktur, sondern zusätzlich auch die biofilmbildenden Eigenschaften der Mutanten, da EPS ein Hauptbestandteil der Biofilmmatrix ist (Abb. 14).

Die in dieser Arbeit verwendeten *C. sakazakii*-Stämme ES 5, 21122 und 21029 gehören zum Serotyp O2 und sind somit in ihrer O-Antigen-Struktur identisch. Die *wzx*-Deletion bei *C. sakazakii* ES 5 und *C. sakazakii* 21029 wurde mittels Sequenzierung, als auch eines

am Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch der Ludwig-Maximilians-Universität München entwickelten, Serotyp O2 spezifischen monoklonalen Antikörpers im indirekten ELISA bestätigt (Scharinger *et al.*, 2016). Die Auswirkung dieser Mutation auf die Biofilmbildung spiegeln sich bei der *wzx*-Mutante von *C. sakazakii* ES 5 in einer deutlich rauerer Kolonieoberfläche, bei *C. sakazakii* 21029 Δwzx in einer weniger mukösen Koloniemorphologie wieder. Die Feststellung, dass die Fähigkeit zur Biofilmproduktion durch die Deletion des *wzx*-Gens nicht vollständig inhibiert wird, lässt den Schluss zu, dass Biofilm nicht nur aus einer bzw. zwei Komponenten (EPS/LPS) besteht, sondern noch andere Polysaccharide (z.B. Zellulose oder verschiedene EPS) eine Rolle spielen.

Bioinformatische Untersuchungen von Dr. K. Schauer (unpubliziert) zur EPS-Produktion bei *C. sakazakii* ergaben Hinweise darauf, dass einige Stämme verschiedene EPS produzieren können und darüber hinaus andere Transportmechanismen zur Translokation aktivierter Zuckermoleküle in den periplasmatischen Raum möglich sind. Alternative Kohlenhydrat-Transportmechanismen konnten z.B. durch gezielte Mutation bei *Cyanobacterium synechocystis* nachgewiesen werden (Fisher *et al.*, 2013).

Kolansäure (CA) ist ein von vielen *Enterobacteriaceae* synthetisiertes Exopolysaccharid (EPS), welches in die Umwelt sekretiert wird und zur Stabilität des Biofilmgerüsts beiträgt (Danese *et al.*, 2000). Bei *E. coli* konnte das CA Gen-Cluster vollständig charakterisiert und das *wzx*-Gen als Bestandteil dieses Clusters lokalisiert werden. Da Ogrodzki & Forsythe (2015) bei allen 19 untersuchten *C. sakazakii*-Stämmen die Biosynthese von CA nachweisen konnten (Ogrodzki and Forsythe, 2015), gilt es als wahrscheinlich, dass die Sekretion von CA bei den in dieser Arbeit untersuchten Mutanten durch die Deletion des *wzx*-Gens betroffen ist. Da die Mutanten trotz des fehlenden *wzx*-abhängigen Transportmechanismus noch Biofilm produzieren können, ist davon auszugehen, dass der fehlende Anteil an CA durch einen höheren Anteil anderer Polysaccharide kompensiert werden könnte.

Bei *C. sakazakii* ist die Bildung einer polymeren Kapsel und die Produktion von Zellulose als wichtiger Schutzmechanismus gegen äußere Umwelteinflüsse beschrieben (Iversen *et al.*, 2007, Zogaj *et al.*, 2003). Bisher wurde jedoch die Kapselbildung nur für den *C. sakazakii*-Stamm 21122 in der Literatur beschrieben (Iversen *et al.*, 2007). Die Ergebnisse dieser Arbeit belegen jedoch, dass die Bildung einer Kapsel auch bei den *C. sakazakii*-Stämmen ES 5 und 21029 stattfindet (Abb. 14). Um Aufschluss über den Anteil an zellgebundenen EPS (Kapsel) an der Gesamtmenge des isolierten EPS zu

bekommen, wurden die Anteile an extrazellulärem EPS denen der zellgebundenen EPS graphisch gegenübergestellt (Abb. 14). Aus dieser Darstellung geht hervor, dass der Anteil an zellgebundenen EPS bei allen Stämmen und den Δwzx -Mutanten höher ist als der der extrazellulären EPS, sodass die Bildung einer Kapsel bei den getesteten Stämmen als erwiesen gilt.

In Anlehnung an die Struktur von LPS ist auch die Kapsel aus hochkonservierten Regionen und einer variablen Region aufgebaut. Die Gene, die für die jeweiligen Regionen kodieren, wurden bereits für *E. coli* und andere *Enterobacteriaceae* identifiziert. Sie sind in drei Gen-Clustern organisiert und spielen vermutlich auch bei der Kapselbildung von *Cronobacter* eine Rolle (Ogrodzki and Forsythe, 2015). Die für die Synthese der hochkonservierten Regionen verantwortlichen Gene kodieren für Enzyme und Transportproteine, welche die Kettenelongation und die Translokation der Polysaccharide an die Zelloberfläche initiieren. Die Gene für die hochkonservierte Region der Kapsel kodieren für Enzyme, welche die Biosynthese der K-Antigen spezifischen kapsulären Polysaccharide (CPS) katalysieren (Willis *et al.*, 2013, Whitfield, 2006).

Die Kapsel umgibt die Bakterienzelle in Form einer hydratisierten Schutzschicht, welche aus hochmolekularen Polysacchariden besteht, und bietet so Schutz vor Austrocknung und dem Immunsystem des Wirts (Willis and Whitfield, 2013). Die Biosynthese und der Transport der K-Antigene zur Bildung der Kapsel und der O-Antigene zur Synthese von LPS an der äußeren Zellmembran erfolgt vollkommen unabhängig voneinander, da sie durch unterschiedliche Gen-Cluster kodiert werden. Dies bedeutet, dass die Mutation des wzx -Gens keinen Effekt auf die Bildung der Kapsel hat.

Neben dem biochemischen Nachweis von extrazellulären und zellgebundenen EPS im Biofilm gelang in dieser Arbeit anhand phänotypischer und molekularbiologischer Methoden der Nachweis von Zellulose, das ein weiterer wichtiger Bestandteil der Biofilmmatrix bei *C. sakazakii* darstellt. Der phänotypische Nachweis auf CRA-Platten basiert auf der Bindung des Farbstoffs Kongorot an Zellulose. Proteinhaltige Komponenten werden hingegen durch den im Medium enthaltenen Farbstoff Coomassie-Blau angefärbt. Der *C. sakazakii*-Stamm ES 5 und seine wzx -Mutante bildeten auf CRA-Platten rote, trockene und raue Kolonien, ähnlich der Koloniemorphologie *pdar* (*pink, dry, and rough*) bei Salmonellen. Dieser Morphologietyp ist ein Indiz für die Zelluloseproduktion und deutet darauf hin, dass keine Curli-Fimbrien von *C. sakazakii* ES 5 gebildet werden (Romling *et al.*, 1998). Diese Feststellung stimmt mit den Ergebnissen von Hartmann *et al.*

überein, welche die Zellulosebildung von *C. sakazakii* ES 5 und verschiedener Biofilmmutanten untersuchten. Im Vergleich zu der roten, trockenen und rauen Koloniemorphologie des Zellulose produzierenden *C. sakazakii*-Stamms ES 5, waren die Kolonien der Zellulose-Mutanten feucht, glänzend und weißlich, vergleichbar mit dem Morphologietyp *saw* (*smooth and white*) bei Salmonellen, was ein Indiz dafür ist, dass weder Zellulose noch Curli-Fimbrien gebildet werden (Hartmann *et al.*, 2010). Die Kolonien von *C. sakazakii* 21122 und *C. sakazakii* 21029 sowie der *wzx*-Mutante waren in ihrer Farbintensität weniger stark als *C. sakazakii* 21029, was dafür sprechen würde, dass diese Stämme quantitativ weniger Zellulose als *C. sakazakii* ES 5 produzieren. Die genotypische Bestätigung erfolgte durch den Nachweis der Zellulose-Synthase-Operon-Gene *bcsABC* mittels PCR. Die Rolle der Zellulose bei der Biofilmbildung wurde bereits durch umfangreiche Studien bei Salmonellen, *E. coli* und anderen Vertretern der Familie *Enterobacteriaceae* untersucht (Zogaj *et al.*, 2003). Als am häufigsten in der Natur vorkommendes Biopolymer (Ross *et al.*, 1991) dient Zellulose vor allem als Schutzbarriere vor mechanischen und chemischen Einflüssen (Matthysse *et al.*, 1981). Bei Salmonellen und *E. coli* werden Gene zur Biosynthese von Zellulose durch das *bcsABZC* und *bcsEFG* Operon kodiert, wobei *bcsA* für die katalytische Zellulose-Synthase-Untereinheit, *bcsB* für das zyklische-di-GMP-Bindeprotein und *bcsC* für das Enzym Zellulose-Oxidoreduktase kodieren. Die Funktion des Gens *bcsZ* konnte bisher nicht identifiziert werden (Ross *et al.*, 1991, Zogaj *et al.*, 2001). Bei *C. sakazakii* wurden homologe Gene des Zellulose-Synthase-Operons identifiziert (Zogaj *et al.*, 2003, Grimm *et al.*, 2008, Hartmann *et al.*, 2010). Studien mit *C. sakazakii bcsA/B*-Mutanten ergaben, dass die Mutation zu reduzierter Biofilmbildung und Zellaggregation führt und die Zellulose-Produktion vollständig eingestellt wird (Hu *et al.*, 2015). Somit gilt es als erwiesen, dass das *bcsABZC*-Operon auch bei *C. sakazakii* für die Synthese von Zellulose verantwortlich ist. Auf Grundlage des molekularbiologischen Nachweises der *bcsABC*-Gene mittels PCR sowie des phänotypischen Nachweises mittels CRA-Platten konnte in dieser Arbeit die Zellulose-Produktion bei den drei *C. sakazakii*-Stämme ES 5, 21122 und 21029 eindeutig nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit verdeutlichen, dass die Biofilmbildung ein komplexer, zeitlich strukturierter Prozess ist, der in Abhängigkeit individueller Einflussfaktoren stattfindet. Die Synthese von LPS, EPS, Kapsel und Zellulose unterliegt einer komplexen Genregulation, welche in Abhängigkeit äußerer Umwelteinflüsse und des jeweiligen *C. sakazakii*-Stamms die Expression bestimmter Gene verstärkt oder inhibiert. Diese

individuellen Anpassungsmechanismen erklären, warum die Biofilmbildung bei *C. sakazakii* ES 5 auf Festmedium gering und in flüssigem Minimalmedium im Vergleich zu *C. sakazakii* 21122 und *C. sakazakii* 21029 stärker ist (Abb. 3, Abb. 6, Abb. 10). Da der *C. sakazakii*-Stamm 21029 auf Festmedium eine sehr muköse, glänzende Koloniemorphologie hat, jedoch einen geringeren Gesamtpolysaccharidgehalt im Vergleich zu *C. sakazakii* ES 5 aufweist (Abb. 14), basiert der muköse Phänotyp von 21029 auf Festmedium nicht auf einer verstärkten Polysaccharid-Produktion, sondern resultiert vermutlich aus einer erhöhten Wasserretention.

Die in dieser Arbeit durchgeführte biochemische Analyse des Biofilms umfasste neben der Bestimmung des Polysaccharidanteils auch den Anteil an Proteinen in der Biofilmmatrix. Die Messung des Proteinanteils mittels Kristall-Violett-Färbung nach Proteinase K-Behandlung ergab für *C. sakazakii* 21122 und *C. sakazakii* 21029 einen sehr geringen Proteingehalt, sodass der Hauptanteil des Biofilms durch zellgebundene und extrazelluläre Polysaccharide gebildet wird. Die Messung des Proteingehalts von *C. sakazakii* ES 5 hingegen ergab eine um 56,3 % reduzierte Biofilmbildung nach Proteinase K-Behandlung. Dieses Ergebnis bedeutet, dass der Proteingehalt einen relativ hohen Anteil an seiner Gesamtbiofilmmatrix ausmacht. Im Gegensatz zu *C. sakazakii* 21029 bewirkt die Deletion des *wzx*-Gens bei *C. sakazakii* ES 5 keinen erhöhten Proteingehalt im Biofilm, da das relative Verhältnis der Ergebnisse bei der Messung mit und ohne Proteinase K-Behandlung bei *C. sakazakii* ES 5 und seiner *wzx*-Mutante ähnlich ist. Bei *C. sakazakii* 21029 hingegen führt die *wzx*-Mutation zu einem Anstieg des Proteingehalts im Biofilm (Abb. 13.). Dies wird durch die Abnahme der Biofilmmenge um 72 % nach Proteinase K-Behandlung deutlich. Die unterschiedlichen Auswirkungen der *wzx*-Mutation auf den Proteingehalt im Biofilm bei den *C. sakazakii*-Stämmen ES 5 und 21029 ist entweder auf den stammspezifischen Proteingehalt im Biofilm von *C. sakazakii* ES 5 und *C. sakazakii* 21029 zurückzuführen oder steht in Korrelation mit der Menge an produzierter Biofilmmatrix. So ist der geringe Unterschied bei der Messung des Proteingehalts nach Proteinase K-Behandlung bei *C. sakazakii* ES 5 und *C. sakazakii* ES 5 Δwzx vermutlich auf die geringere Menge an produzierter Biofilmmatrix zurückzuführen, was dazu führt, dass die Proteinase K leichter Zugang zu den Proteinen erhält. Im Gegensatz dazu produziert *C. sakazakii* 21029 viel Biofilmmatrix und erschwert somit dem Enzym den Zugang zu den Proteinen im Vergleich zu seiner *wzx*-Mutante, die weniger Biofilm produziert. Somit ist dieses Ergebnis auch ein Beispiel für die Schutzfunktion des Biofilms gegenüber schädlichen Substanzen.

Innerhalb des Biofilms differenzieren sich genetisch identische Klone infolge unterschiedlicher Genexpression in zwei Subpopulationen: Aggregatzellen und planktonische Zellen (Lenz *et al.*, 2008, Kragh *et al.*, 2016). Diese Differenzierung erfolgt in Abhängigkeit von der Position der Zellen innerhalb des Biofilmgerüsts, der Ressourcen-Verfügbarkeit und dem interzellulären Kontakt (Stewart *et al.*, 2008). Dieser Anpassungsmechanismus bewirkt bei *C. sakazakii*-Aggregatzellen die Repression der Flagellensynthese sowie die verstärkte Produktion von EPS. Dies ermöglicht einen besseren Kontakt der Biofilm assoziierten Zellen mit der abiotischen Oberfläche und verstärkt die Stabilität des Biofilmgerüsts (Watnick *et al.*, 2000). Die Initiation der Biofilmbildung beginnt mit der Adhäsion einzelner Zellen an die Oberfläche und deren kontinuierlichen Teilung. Im Verlauf dieses Prozesses kommt es zur Entstehung und Reifung eines dreidimensionalen Biofilmgerüsts (Abb. 1) (Costerton *et al.*, 1995). Im Vergleich zu motilen, planktonischen Zellen, die sich von der Biofilmmatrix separieren, neue Oberflächen kolonisieren und die Neubildung des Biofilms initiieren, besteht die Aufgabe der Aggregatzellen in dem Erhalt des bestehenden Biofilms (Purevdorj-Gage *et al.*, 2005, Stoodley *et al.*, 2001). Die protektiven Eigenschaften des Biofilms werden insbesondere durch die Akkumulation osmoprotektiver Moleküle, Kapselbildung und die Produktion extrazellulärer Polysaccharide vermittelt und ermöglichen das Überleben in Phasen der Austrocknung (Breeuwer *et al.*, 2003, Feeney and Sleator, 2011, Riedel and Lehner, 2007, Lehner *et al.*, 2005).

Insbesondere für die Herstellung von Säuglingsnahrung stellt dies eine enorme Herausforderung dar, da *C. sakazakii* in der Lage ist, den Trockensprühprozess während der PIF-Herstellung zu überleben und über einen langen Zeitraum in PIF zu persistieren (Barron and Forsythe, 2007). Das Ergebnis einer Langzeitstudie von Barron und Forsythe (2007) zur Persistenz von *Enterobacteriaceae* in PIF ergab, dass es sich bei allen *C. sakazakii*-Stämmen, die nach einem Zeitraum von 2,5 Jahren isoliert werden konnten, um Kapselbildner handelte. Die Feststellung, dass die Fähigkeit zur Kapselbildung für das Überleben von *C. sakazakii* unter Stressbedingungen eine große Rolle spielt, gab Anlass dazu, die in dieser Arbeit als Kapselbildner charakterisierten Stämme und ihre Subpopulationen hinsichtlich ihrer Fähigkeit, unter Laborbedingungen den Austrocknungsprozess zu überleben, zu untersuchen. Dazu wurden die *Cronobacter*-Kulturen in Aggregatzellen und planktonische Zellen getrennt, in einer 24-Well Platte ausgetrocknet und der Anteil an kultivierbaren Zellen mittels CFU-Bestimmung auf Festmedium über einen definierten Zeitraum ermittelt (Abb. 15). Obwohl auf Festmedium

keine Kultivierung mehr möglich war, konnte die Vitalität der Zellen fluoreszenzmikroskopisch nach Lebend-Tod-Färbung nachgewiesen werden. Demnach ist die Abnahme der CFU (Abb. 15) nicht auf den Tod der Zellen, sondern auf den Übergang in den sogenannten VBNC-Zustand zurückzuführen. Das unterschiedliche Verhalten von Aggregatzellen und planktonischen Zellen, als Reaktion auf die Austrocknung als extreme Form von osmotischem Stress, bestätigt die Hypothese, dass sich Aggregatzellen und planktonische Zellen in ihrer Genexpression unterscheiden. Während Aggregatzellen die Aufrechterhaltung des Biofilms ermöglichen, indem sie ihren Stoffwechsel reduzieren und vorzeitig in ein vitales aber nicht kultivierbares (VBNC) Stadium übergehen, besteht die Funktion der planktonischen Zellen darin, neue Oberflächen zu besiedeln und die Verbreitung des Biofilms zu gewährleisten. Diese Motilität bedarf eines aktiven Stoffwechsels, der die Energie zur Replikation und Fortbewegung bereitstellt. In der Folge findet der Übergang der planktonischen Zellen in den VBNC-Zustand erst durch längerfristige Einwirkung des Stressfaktors Austrocknung statt. Dies erklärt die geringere Abnahme der CFU innerhalb der ersten sieben Tage sowie den späteren Übergang in den VBNC-Zustand bei planktonischen Zellen im Vergleich zu den Aggregatzellen (Abb. 15). Die Auswirkungen von äußeren Stressfaktoren auf die Genexpression von *C. sakazakii* wurde in zahlreichen Studien untersucht. Untersuchungen von Feeney und Sleator (2011) zur Überlebensfähigkeit des klinischen *C. sakazakii*-Stamms BAA-894 unter niedrigen a_w -Bedingungen ergab Homologien zu der osmotischen Stressantwort von *E. coli* und Salmonellen, die auf der Akkumulation von Elektrolyten (Kalium) und Glutamat basiert und auf diese Weise die Zellintegrität aufrechterhält (Feeney and Sleator, 2011). Riedel und Lehner (2007) hingegen nutzten Proteomanalysen, um Proteine zu identifizieren, die eine Rolle in der osmotischen Stressantwort spielen. Bei Kultivierung in einer Natriumchlorid-Lösung ergab das Proteinprofil eine down-Regulation zentraler metabolischer Stoffwechselwege, wohingegen bei Austrocknung Proteine synthetisiert wurden, welche Schutz und Strukturfunktionen hatten (Riedel and Lehner, 2007). Außerdem enthalten alle *C. sakazakii*-Stämme Gene für die β -Carotin Synthese, welche das Bakterium nicht nur vor Sauerstoffradikalen schützen, sondern auch die Toleranz gegenüber physikalischer Austrocknung erhöhen (Johler *et al.*, 2010).

Auf Grundlage der Ergebnisse dieser Arbeit lässt sich schlussfolgern, dass Biofilmbildung ein komplexer, zeitlich strukturierter Prozess ist, der von äußeren Umwelteinflüssen wie der Temperatur und dem Nährstoffangebot abhängig ist. Die Fähigkeit zur Biofilmbildung sowie seine Zusammensetzung weist stammspezifische Unterschiede auf. Der Großteil der

Biofilmmatrix besteht aus Polysacchariden, wobei die Kapsel- und Zellulosebildung über andere Mechanismen wie die LPS- und EPS-Synthese reguliert werden. Die Differenzierung der Zellpopulation in Aggregatzellen und planktonische Zellen ermöglicht eine klare funktionale Auftrennung, welche den Erhalt und gleichzeitig die Verbreitung des Biofilms ermöglicht. Die protektiven Eigenschaften des Biofilms vor Austrocknung zu schützen, wurden in dieser Arbeit bestätigt und verdeutlichen, dass die Biofilmbildung entscheidend zum Überleben von *C. sakazakii* in der Umwelt beiträgt.

1.2. Die Bedeutung des Biofilms für die Virulenz von *C. sakazakii*

Die Bedeutung des Biofilms für das Überleben in der Umwelt wurde bereits in zahlreichen Studien demonstriert (Costerton *et al.*, 1995, O'Toole *et al.*, 2000), jedoch konnte bisher noch keine Verbindung zur Virulenz hergestellt werden. Da die Fähigkeit zur Invasion in intestinale Epithelzellen, den Ort der primären lokalen Infektion, eine wichtige Rolle bei der Pathogenese von *C. sakazakii* spielt, wurde der Einfluss der Biofilmbildung auf die Invasivität untersucht. Dazu wurde die Biofilmbildung der verwendeten Stämme unter standardisierten Bedingungen durch Kultivierung in Minimalmedium bei Raumtemperatur induziert, in Aggregatzellen und planktonische Zellen aufgetrennt und ein Gentamicinassay mit Caco-2-Zellen durchgeführt (Abb. 22). Im Vergleich dazu wurde das Invasionsverhalten der *C. sakazakii*-Stämme nach Anzucht bei 37 °C in LB-Medium überprüft, bei der keine Induktion der Biofilmbildung stattfand (Abb. 21). Im Gegensatz zu den Bakterienzellen, welche bei Raumtemperatur kultiviert wurden und sich in der stationären Phase befanden, waren die *Cronobacter*-Zellen der Tagkultur nach Anzucht bei 37 °C in der logarithmischen Wachstumsphase. Dementsprechend waren die Invasionsraten aller untersuchten *Cronobacter*-Stämme nach Anzucht bei 37 °C (Abb. 21) im Vergleich zu den Aggregatzellen und den planktonischen Zellen nach Kultivierung bei Raumtemperatur (Abb. 22) deutlich höher. Die temperaturabhängige Expression von Virulenzgenen wurde bei vielen Pathogenen, wie z.B. *L. monocytogenes*, gezeigt. Demnach wird die Aktivität von Virulenzfaktoren in Abhängigkeit von der Temperatur entweder gehemmt oder induziert (Leimeister-Wachter *et al.*, 1992). Aufgrund der deutlich höheren Invasivität nach Anzucht bei 37 °C ist zu vermuten, dass die Virulenz von *C. sakazakii* ebenfalls durch temperaturabhängige Regulationsmechanismen gesteigert oder gehemmt werden kann.

Bei *Cronobacter* ist bereits bekannt, dass sich verschiedene Spezies und Subspezies bezüglich ihrer Virulenz und Pathogenität unterscheiden. Die deutlichen Unterschiede in

der Invasivität der untersuchten Stämme lässt jedoch die Schlussfolgerung zu, dass die Virulenz innerhalb der Spezies *C. sakazakii* stammspezifisch ist: Der *C. sakazakii*-Stamm ES 5 wies mit einer Invasionsrate von 1,45 % in nicht ausdifferenzierten Caco-2-Zellen bzw. mit 7,12 % in polarisierten Caco-2-Zellen die höchste Invasivität auf. Die Invasionsraten von *C. sakazakii* 21122 und *C. sakazakii* 21029 lagen hingegen mit jeweils 0,05 % und 0,003 % in nicht ausdifferenzierten bzw. mit 1,73 % und 0,41 % in polarisierten Caco-2-Zellen deutlich niedriger. Die Mutation des *wzx*-Gens bewirkte bei *C. sakazakii* ES 5 eine geringe und bei *C. sakazakii* 21029 keine verringerte Invasivität. Ein ähnliches Bild ergab sich auch bei der Untersuchung der Invasivität von Aggregatzellen und planktonischen Zellen, da die beiden Subpopulationen von *C. sakazakii* ES 5 sowohl in nicht ausdifferenzierten als auch in polarisierten Caco-2-Zellen die höchsten Invasionsraten aufwiesen (Abb. 22). Bei der Invasion lagen somit die absoluten Werte in den polarisierten Zellen durchweg höher als in den nicht ausdifferenzierten Zellen, wobei die relativen Werte aus dem Vergleich der Stämme untereinander vergleichbar waren. Somit resultiert die im Verlauf des Differenzierungsprozesses stattfindende Intensivierung der Zell-Zell-Kontakte (*tight junctions*) sowie die zunehmende Auftrennung in apikale und basolaterale Zellkompartimente in einer deutlich höheren Invasivität und bestätigt die Relevanz eines intakten Wirtszell-Zytoskeletts für die Invasion von *C. sakazakii* (Kim and Loessner, 2008, Nair and Venkitanarayanan, 2007).

Während der bakteriellen Biofilmbildung erfolgt die Differenzierung genetisch identischer Klone in die zwei Subpopulationen Aggregatzellen und planktonische Zellen. Infolge dieser Spezialisierung kommt es zu stoffwechselabhängigen Anpassungen, welche die Voraussetzung zur Erfüllung ihrer Funktion innerhalb des Biofilmgerüsts schaffen. Während die Funktion der planktonischen Zellen die Verbreitung und Rekolonisation des Biofilms ist, ermöglichen Aggregatzellen den Erhalt des Biofilms, indem sie an die abiotische Oberfläche binden und durch die Produktion von Polysacchariden eine physikalische Schutzschicht bilden (Purevdorj-Gage *et al.*, 2005, Stoodley *et al.*, 2001). Um einen besseren Kontakt zur Oberfläche zu ermöglichen, stellen Aggregatzellen nach Adhäsion an eine feste Oberfläche ihre Motilität durch Repression ihrer Flagellensynthese ein. Die Bedeutung der Flagellen für die Virulenz von *C. sakazakii* konnten Hartmann *et al.* anhand von Transposonmutanten zeigen, deren Verlust der Flagellen zu einer deutlichen Reduzierung der Adhäsionsfähigkeit an Caco-2-Zellen führte (Hartmann *et al.*, 2010). Die geringe Invasivität der Aggregatzellen in nicht ausdifferenzierten Caco-2-Zellen könnte

somit durch eine bereits reduzierte Adhäsionsfähigkeit hervorgerufen werden. Darüber hinaus scheinen die Veränderungen des Stoffwechsels gleichzeitig mit einer verminderten Expression der Virulenzgene einherzugehen, die in einer reduzierten Invasivität resultiert (Abb. 22).

1.3. VBNC-Zustand – raffinierte Überlebensstrategie der Bakterien

In dieser Arbeit wurden die durch den Stressfaktor Austrocknung induzierten VBNC-Zellen von *C. sakazakii* unter verschiedenen Bedingungen reaktiviert und ihre Virulenz im Zellkulturmodell untersucht. Die Existenz von VBNC-Zellen konnte bereits bei über 70 Bakterienspezies, darunter *E. coli*, *L. monocytogenes*, *S. enterica*, *Shigella dysenteriae* und *Vibrio vulnificus* nachgewiesen werden (Oliver, 2010). Die Reduzierung der Stoffwechselaktivität bei gleichzeitiger Aufrechterhaltung lebensnotwendiger Zellfunktionen, wie Atmung (Oliver and Bockian, 1995), Transkription (Lleo *et al.*, 2000) und Proteinsynthese (Rahman *et al.*, 1994), erhöht die Resistenz des Bakteriums gegenüber physikalischen und chemischen Stressbedingungen und ermöglicht das Überleben (Oliver, 2010). Der Übergang in das VBNC-Stadium als strategischer Anpassungsmechanismus an ungünstige Umweltbedingungen impliziert, dass dieser Prozess reversibel ist und die Zellen ihren kultivierbaren Zustand zurückerlangen können (Pinto *et al.*, 2011). Da der Nachweis von Bakterienzellen im VBNC-Stadium mittels Standardnährböden nicht möglich ist (Oliver, 2000), wird die tatsächliche Zahl an vitalen Bakterien oftmals unterschätzt, mit der Folge, dass eine Kontamination von Nahrungsmitteln häufig unentdeckt bleibt (Li *et al.*, 2014).

Das VBNC-Stadium von *C. sakazakii* wurde in dieser Arbeit durch Lebend-Tod-Färbung fluoreszenzmikroskopisch bestätigt (Abb. 16), nachdem eine Kultivierung auf Standardnährböden nicht mehr nachweisbar war. Bisher wurde die Initiierung und die Reaktivierung von *C. sakazakii* VBNC-Zellen sowie ihre Virulenz noch nicht untersucht. Daher wurden in dieser Arbeit *C. sakazakii* VBNC-Zellen durch den Stressfaktor Austrocknung initiiert und die Fähigkeit zur Reaktivierung unter verschiedenen Bedingungen evaluiert. Da der Nachweis von VBNC-Zellen mittels Standardnährmedien entsprechend ISO 22964:2017 nicht möglich ist, wurde den Medien zur nicht selektiven Voranreicherung die Substanzen 8-Hydroxyquinolin und Ammoniumeisen(III)citrat zugesetzt, welche die Voranreicherung von *Cronobacter* spp. verbessern und das Wachstum gestresster Zellen beschleunigen soll (Weber *et al.*, 2009). 8-Hydroxyquinolin ist eine hitzestabile Substanz, welche ähnlich des Selektivstoffs Vancomycin das

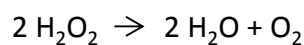
Wachstum Gram-positiver Keime während der selektiven Anreicherung inhibiert und gleichzeitig das Wachstum von *Cronobacter* spp. verbessert (Weber *et al.*, 2009). Die Reaktivierung der VBNC-Zellen in BPW, Magermilch und Minimalmedium mit Zusatz von 8-Hydroxyquinolin und Ammonium Eisen(III)citrat ergab jedoch kein einheitliches Ergebnis. In Magermilch erfolgte die Reaktivierung innerhalb von 48 Stunden relativ schnell, gefolgt von BPW nach 48 Stunden. Minimalmedium hingegen erwies sich für die Reaktivierung als ungeeignet. Obwohl insgesamt nur bei den beiden Subpopulationen von *C. sakazakii* ES 5 und *C. sakazakii* ES 5 Δwzx sowie den Aggregatzellen von *C. sakazakii* 21122 der Übergang in den kultivierbaren Zustand erfolgreich induziert werden konnte, scheint zusätzlich noch der Nährstoffgehalt der Medien bei der Reaktivierung eine Rolle zu spielen. Daher wurde dieser Versuch mit kommerzieller Säuglingsanfangsmilch, welche mit 7,5 g/100 ml einen sehr hohen Kohlenhydratgehalt aufweist, wiederholt. Durch Reaktivierung in steriler trinkfertiger Säuglingsnahrung wurden die Bedingungen während der Rekonstitution von PIF simuliert und gleichzeitig der Einfluss einer potentiellen Begleitflora durch das sterile Produkt ausgeschlossen. Darüber hinaus wurde der Einfluss intestinaler Darmepithelzellen und die von ihnen sezernierten Stoffwechselprodukte durch Verwendung des vorinkubierten Caco-2-Zellüberstands zur Reaktivierung der VBNC-Zellen untersucht. Die Simulation der Magen-Darm-Passage unter *in vitro* Bedingungen sollte Hinweise über die Fähigkeit zur Reaktivierung *in vivo* unter Berücksichtigung physiologischer pH-Werte und Enzymsekretion geben. Zwar gilt die Virulenz von Pathogenen im VBNC-Zustand grundsätzlich als nicht erwiesen, jedoch konnten erste Studien bereits zeigen, dass VBNC-Zellen durch schnelle Reaktivierung innerhalb des Wirts ihre Virulenz zurückerlangen und so schwerwiegende Infektionen hervorrufen können (Oliver and Bockian, 1995, Baffone *et al.*, 2003).

Die Ergebnisse der Reaktivierung in Anfangsmilch und im vorinkubierten Caco-2-Zellüberstand konnten zeigen, dass alle getesteten Stämme und ihre *wzx*-Mutanten in beiden Medien von dem nicht kultivierbaren in den kultivierbaren Zustand übergehen können. Somit scheinen beide Medien eine oder mehrere Substanzen zu beinhalten, die alleine oder gemeinsam als Inducer den Übergang in den kultivierbaren Zustand initiieren. Die biochemische Zusammensetzung des RPMI-Zellkulturmediums umfasst neben D-Glukose (2 g/l), ein breites Spektrum an Aminosäuren sowie Vitaminen. Die Vorarbeiten von Dr. N. Jeßberger (unveröffentlicht) zur Simulation der intestinalen Wachstumsbedingungen ergaben, dass die Caco-2-Zellen einen Großteil der Glukose im Medium metabolisieren. Sie setzte dem RPMI-Medium Glukose zu, sodass die

Gesamtkonzentration zum Startzeitpunkt 10 g/l Glukose betrug. Nach einer 33-stündigen Inkubation mit ausdifferenzierten Caco-2-Zellen wurde eine Abnahme der Glukosemenge von 10 g/l auf 7 g/l beobachtet (mündliche Mitteilung Dr. N. Jeßberger). Aufgrund dieser Feststellung kommt Glukose als Inducer für die Reaktivierung der VBNC-Zellen nicht in Betracht, da nach einer 24-stündigen Vorinkubation des RPMI-Mediums mit ausdifferenzierten Caco-2-Zellen die enthaltene Gesamtglukosemenge (2 g/l) vollständig verstoffwechselt wurde.

Untersuchungen von Pinto *et al.* (2011) zum Einfluss verschiedener Aminosäuren auf die Reaktivierung von *E.coli*-VBNC-Zellen identifizierten eine Kombination aus Methionin, Glutamin, Leucin und Threonin als Inducer, wobei Methionin und Glutamin eine essentielle Bedeutung zukam (Pinto *et al.*, 2011). Die Tatsache, dass die Reaktivierung in reinem RPMI 1640-Medium trotz Anwesenheit von zahlreichen Aminosäuren erfolglos blieb, lässt die Vermutung zu, dass Aminosäuren bei der Reaktivierung von *C. sakazakii* eine untergeordnete Rolle spielen.

Senoh *et al.* erkannten in ihren Studien einen Zusammenhang zwischen der Reaktivierung verschiedener Pathogene und der Ko-Kultivierung mit eukaryotischen Zellen (Senoh *et al.*, 2012) und identifizierten das Enzym Katalase als Inducer des Reaktivierungsprozesses (Senoh *et al.*, 2015). Durch die Behandlung eukaryotischer Zellen mit dem Katalase-Inhibitor 3-amino-1,2,4-triazol konnten sie ihre Hypothese belegen (Senoh *et al.*, 2015). Katalase ist ein weitverbreitetes Enzym, welches in nahezu allen lebenden Organismen die Umsetzung des zytotoxischen Stoffwechselzwischenproduktes Wasserstoffperoxid in Wasser und Sauerstoff katalysiert:



Die Induktion des VBNC-Stadiums bei *V. vulnificus* durch Kältestress führt zum Verlust dieser Katalase-Aktivität, erhöht somit die Wasserstoffperoxid-Sensitivität der Zellen und führt schließlich dazu, dass VBNC-Zellen auf Nährböden nicht mehr kultivierbar sind (Kong *et al.*, 2004).

Über das Drüsengewebe laktierender Tiere gelangt das Enzym Katalase in die Milch (König *et al.*, 1914). Somit besteht die Möglichkeit, dass Katalase auch in der verwendeten Säuglingsnahrung vorliegt und als Inducer für die VBNC-Zellen von *C. sakazakii* wirken könnte. Die Tatsache, dass sowohl vorinkubiertes RPMI-Medium als auch Säuglingsanfangsmilch die beiden Medien waren, in denen sich die VBNC-Zellen von

C. sakazakii am schnellsten und deutlichsten reaktivierten und in beiden Medien das Vorhandensein des Enzyms Katalase als wahrscheinlich gilt, lässt die Schlussfolgerung zu, dass die Induktion in den kultivierbaren Zustand von *C. sakazakii* auf das Enzym Katalase zurückzuführen ist. Diese Hypothese wurde durch das Ergebnis der erfolgreichen Reaktivierung innerhalb von 16-24 Stunden nach Zugabe boviner Katalase (Kapitel 2.5) bestätigt. Insgesamt verlief der Reaktivierungsprozess in Anfangsmilch schneller als im vorinkubierten Caco-2-Zellüberstand, sodass möglicherweise der hohe Nährstoffgehalt des Mediums die Reaktivierung unterstützt. Eine mögliche Erklärung für die verzögerte Reaktivierung von Aggregatzellen im Vergleich zu den planktonischen Zellen im vorinkubierten Caco-2-Zellüberstand von *C. sakazakii* 21122, *C. sakazakii* ES 5 und *C. sakazakii* ES 5 Δwzx (Abb. 18) ist vermutlich auf die veränderte Stoffwechselaktivität zurückzuführen. Auf Grundlage der in dieser Arbeit untersuchten Medien stellt sich das Potential der Medien zur Reaktivierung der VBNC-Zellen wie folgt dar:

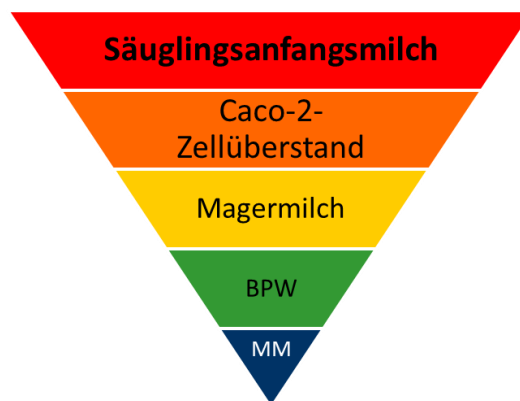


Abb. 39: Übersicht der Medien und ihr Effekt auf die Reaktivierung von *C. sakazakii* VBNC-Zellen.

Die Infektion mit *Cronobacter* spp. beim Säugling erfolgt hauptsächlich peroral über kontaminierte Säuglingsnahrung (Biering *et al.*, 1989, Simmons *et al.*, 1989, Muytjens and Kollee, 1990). Neben der noch nicht völlig ausgebildeten Darmschranke sowie dem noch nicht vollständig ausgeprägten Immunsystem, werden der erhöhte pH-Wert des Magensaftes und die Pufferkapazität der Milch als Ursache für die erhöhte Infektionsrate bei Neugeborenen diskutiert (Kim and Loessner, 2008, Lehner *et al.*, 2013, Townsend *et al.*, 2007). Im Gegensatz zu Erwachsenen variiert der pH-Wert je nach Alter des Säuglings zwischen 2,9 und 5,3 bei sechs Tage alten und zwischen 4,6 und 5,8 bei 7-15 Tage alten Neugeborenen (Sondheimer *et al.*, 1985). Da das Wachstum von *C. sakazakii* bis zu einem pH-Wert von 4,5 beschrieben wurde, gilt es als wahrscheinlich, dass *C. sakazakii* die Magenpassage eines Säuglings überlebt, wobei stammspezifische Unterschiede in der Säuretoleranz zu berücksichtigen sind (Alvarez-Ordóñez *et al.*, 2012, Zhu *et al.*, 2013).

Darüber hinaus konnte in einer Studie von Edelson-Mammel *et al.* bei einer Gruppe von insgesamt 10 *Cronobacter* spp.-Stämmen die Überlebensfähigkeit bei einem pH-Wert von 3,5 über einen Zeitraum von 5 Stunden nachgewiesen werden (Edelson-Mammel *et al.*, 2006). Zusätzlich bewirkt die Pufferkapazität der Milch einen Anstieg des pH-Wertes während der Rekonstitution von PIF.

Die in dieser Arbeit demonstrierte erfolgreiche Reaktivierung von *C. sakazakii* in Säuglingsanfangsmilch gab Anlass dazu, zu überprüfen, ob VBNC-Zellen in Säuglingsnahrung auch unter simulierten Magen-Darm-Bedingungen in der Lage sind, in die kultivierbare Form überzugehen, da bei Einhaltung der Zubereitungsempfehlung für PIF nur wenige Minuten zwischen der Rekonstitution und der Verabreichung liegen und somit eine Reaktivierung vor Kontakt mit dem Magen-Darm-Trakt des Säuglings unwahrscheinlich ist. Dazu wurden *in vitro* neben dem pH-Wert auch die Konzentration der Verdauungsenzyme Lipase, Pepsin, Galle und Pankreatin während der Magen-Darm-Passage simuliert. Der verwendete Start pH-Wert von 5 basiert auf der Kombination aus saurem pH-Wert des Magens und der Pufferkapazität der Milch (Bourlieu *et al.*, 2014). Bei diesem pH-Wert liegt die Aktivität der Lipase in ihrem optimalen Bereich, jedoch ist die Aktivität der Proteasen (Pepsin), deren Optimum bei einem pH-Wert von 1,5-2,2 liegt, limitiert (Schlamowitz *et al.*, 1959). Mit Ausnahme der Aggregatzellen von *C. sakazakii* ES 5 und *C. sakazakii* 21029 Δwzx , konnte der Übergang in die kultivierbare Form der beiden Subpopulationen aller getesteten Stämme induziert werden. Dieses Ergebnis bedeutet, dass *C. sakazakii* seine Säuretoleranz auch beim Übergang in den nicht kultivierbaren Zustand beibehält. Die Kapsel- und Zellulosebildung fungiert zusätzlich als Schutzbarriere vor äußeren Umwelteinflüssen und ist als Ursache für die erhöhte Säuretoleranz in Betracht zu ziehen. Der Grund, warum die Aggregatzellen von *C. sakazakii* ES 5 und *C. sakazakii* 21029 Δwzx nicht zu reaktivieren waren, konnte nicht geklärt werden. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass diese Aggregatzellen nach sechs monatiger Austrocknung in Minimalmedium ihren Stoffwechsel derart reduziert haben, dass sie ihre Fähigkeit zur Reaktivierung verloren haben.

Obwohl VBNC-Zellen grundsätzlich als nicht virulent gelten, können diese durch schnelle Reaktivierungsprozesse in die kultivierbare Form übergehen, ihre Virulenz zurück erlangen und schwerwiegende Infektionen auslösen. Anhand eines modifizierten Gentamicinassays wurde in dieser Arbeit die Virulenz der VBNC-Zellen von *C. sakazakii* nach Übergang in den kultivierbaren Zustand eindeutig nachgewiesen. Die Tatsache, dass mit Ausnahme der Aggregatzellen von *C. sakazakii* ES 5 ausschließlich planktonische

Zellen aus den Caco-2-Zellen reisoliert werden konnten, verdeutlicht, dass planktonische Zellen virulenter sind als Aggregatzellen. Die zügige Adaptation an höhere Temperatur- und Nährstoffverhältnisse, welche denen des Wirtsorganismus entsprechen, ermöglicht den VBNC-Zellen innerhalb weniger Stunden den Übergang in den kultivierbaren Zustand und die Infektion der Wirtszelle. Während die Aggregatzellen von *C. sakazakii* ES 5 sowie die planktonischen Zellen von *C. sakazakii* ES 5 und der *wzx*-Mutante über die gesamte Dauer des Versuchs intrazellulär persistieren, nimmt die Zellzahl von *C. sakazakii* 21122 nach neun Stunden und die von *C. sakazakii* 21029 und seiner *wzx*-Mutante ab 24 Stunden nach Gentamicin-Zugabe kontinuierlich ab. In Kombination mit dem Ergebnis aus Kapitel 3.2, in dem die höchste Invasivität für die beiden Subpopulationen von *C. sakazakii* ES 5 und seiner *wzx*-Mutante in Caco-2-Zellen gezeigt werden konnte, bedeutet dies, dass *C. sakazakii* ES 5 im Vergleich zu den anderen untersuchten *C. sakazakii*-Stämmen nicht nur die höchste Virulenz im kultivierbaren, sondern darüber hinaus auch im nicht kultivierbaren Zustand aufweist und am besten an das Überleben in der Wirtszelle adaptiert ist. Somit dürfen VBNC-Zellen nicht als avirulent angesehen werden, da die Virulenz von *C. sakazakii* mit dem Übergang in den VBNC-Zustand nicht verloren geht.

Die Ergebnisse dieser Arbeit verdeutlichen, dass der Prozess der Reaktivierung in Säuglingsnahrung vor und nach der Verabreichung von kontaminierter Säuglingsnahrung erfolgen kann. Die Ingestion der VBNC-Zellen bewirkt keine Hemmung dieses Prozesses, sondern fördert die Reaktivierung infolge der Sekretion von Katalase durch intestinale Epithelzellen. Somit stellt das VBNC-Stadium eine große Gefahr für die Lebensmittelsicherheit dar, da ein Nachweis mit konventionellen Kultivierungsmethoden nicht möglich ist und darüber hinaus das Risiko einer Infektion durch Reaktivierung besteht.

2. Einfluss pathogener und probiotischer Bakterien auf die Virulenz von *C. sakazakii*

Trotz hoher Hygienestandards und umfangreicher Überwachungsmethoden kann eine Kontamination von Lebensmitteln mit pathogenen Keimen nicht ausgeschlossen werden. Pulverförmige Säuglingsnahrung ist ein hochsensibles Produkt, dessen Verunreinigung mit pathogenen Mikroorganismen schwerwiegende und lebensbedrohliche Erkrankungen bei Säuglingen hervorrufen kann. Aufgrund des komplexen Produktionsprozesses und der Zugabe hitzesensibler Zutaten, wie beispielsweise Vitamine und Proteine nach der Pasteurisierung, ist eine sterile Herstellung von PIF nicht möglich. Aus diesem Grund sieht

der Gesetzgeber die kontinuierliche mikrobiologische Überprüfung dieses Produktes vor. Die mikrobiologischen Kriterien für Säuglingsnahrung sind in der Verordnung (EG) Nr. 2073/2005 festgelegt, die nach einem vorgegebenen Probennahmeplan die Abwesenheit von *Cronobacter* spp. und *Salmonella* in getrockneter Säuglingsnahrung vorgibt. Darüber hinaus dient die Untersuchung von Verarbeitungsbereichen und Ausrüstungsgegenständen auf andere *Enterobacteriaceae* und *B. cereus* der Überprüfung eines hygienischen Herstellungsprozesses (VO(EG)2073/2005, 2005).

Um das Risiko einer Infektion zu verringern, empfiehlt die *World Health Organisation* (WHO) zur Keimreduktion die Rekonstitution von PIF mit 70°C heißem Wasser sowie den sofortigen Gebrauch bzw. die Lagerung bei unter 5 °C (FAO/WHO, 2007, Silano *et al.*, 2016). Darüber hinaus bieten einige Hersteller ihre Säuglingsnahrung mit einem Zusatz von probiotischen Mikroorganismen an, welche bei Zufuhr in angemessener Menge, die Gesundheit fördern sollen (FAO/WHO, 2006). Dabei handelt es sich um lebende, nicht pathogene Mikroorganismen, die den Intestinaltrakt kolonisieren und einen gesundheitsfördernden Effekt erzielen (Salminen *et al.*, 1999). In einer Stellungnahme (Nr. 025/2015) des Bundesinstituts für Risikobewertung (BfR) zum gesundheitlichen Nutzen von probiotischen Zusätzen in Säuglingsanfangs- und Folgenahrung wird erklärt, dass sich aus Untersuchungen zur Sicherheit und Nutzen von zurzeit eingesetzten Bakterienstämmen keine Hinweise auf unerwünschte Wirkungen bei gesunden Säuglingen ergeben. Das BfR betont jedoch auch, dass weitere Studien wünschenswert sind, um eine zuverlässige Aussage über die Sicherheit der Mikroorganismen für den routinemäßigen Einsatz in Säuglingsnahrung treffen zu können, da nur sehr wenige Studien mit gesunden Säuglingen durchgeführt wurden. Ein gesundheitlicher Nutzen von Säuglingsnahrung mit Zusätzen der bewerteten Bakterienstämme konnte allerdings nicht abgeleitet werden (BfR, 2015).

2.1. Der Einfluss von pathogenen Bakterien in Lebensmitteln für die Virulenz von *C. sakazakii*

Aufgrund ihrer ubiquitären Eigenschaften kann eine Kontamination von Lebensmitteln mit *B. cereus* und *L. monocytogenes* während des Herstellungsprozesses oder im Privathaushalt nicht vollständig vermieden werden (Stenfors Arnesen *et al.*, 2008, Weis *et al.*, 1975). Die Fähigkeit, widerstandsfähige Endosporen auszubilden, erhöht die Resistenz von *B. cereus* gegenüber widrigen Umwelteinflüssen wie Trockenheit und Hitze und ermöglicht dem Bakterium unter verbesserten Umweltbedingungen wieder auszukeimen (Nicholson *et al.*, 2000). Diese Eigenschaft führt dazu, dass *B. cereus* den

Herstellungsprozess von PIF überleben kann und erklärt, warum *B. cereus* als Bestandteil der mikrobiologischen Begleitflora häufig in PIF nachgewiesen werden kann (Crielly *et al.*, 1994, Rueckert *et al.*, 2005, Ronimus *et al.*, 2006, Reyes *et al.*, 2007). Becker *et al.* konnten in 54 % der untersuchten Proben aus der Produktgruppe Trockenmilchprodukte und Säuglingsnahrung eine Kontamination mit *B. cereus* nachweisen (Becker *et al.*, 1994). Vegetative Zellen oder Sporen, die durch kontaminierte Lebensmittel aufgenommen werden, können nach Magenpassage im Darm auskeimen und symptomauslösende Toxine bilden (Clavel *et al.*, 2004). Die aus jeweils drei Einzelkomponenten bestehenden Enterotoxinkomplexe Hämolysin BL (Hbl) (Beecher *et al.*, 1991) und Nicht-hämolytisches Enterotoxin (Nhe) (Lund *et al.*, 1996) bewirken nach der Bindung an intestinale Epithelzellen in einer bestimmten Konformität und Reihenfolge einen zytotoxischen Effekt durch Porenbildung, sodass es zum Austritt von Elektrolyten sowie Flüssigkeit und letztendlich zu wässrigen Durchfällen kommt (Lindback *et al.*, 2010, Didier *et al.*, 2012, Bischofberger *et al.*, 2012, Castiaux *et al.*, 2016).

Bisher wurde der Effekt einer Vorschädigung durch porenbildende *B. cereus* auf die Virulenz von *C. sakazakii* nicht untersucht. In dieser Arbeit wurden daher intestinale Epithelzellen als *in vitro* Modell für den Darm, den Ort der primären lokalen Infektion, für kurze Zeit (5 min) mit einem Hbl und Nhe produzierenden *B. cereus*-Stamm zur Vorporenbildung vorbehandelt und anschließend mit *C. sakazakii* ES 5 infiziert. Da das intestinale Epithel *in vivo* aus verschiedenen Zelltypen aufgebaut ist, die sich hinsichtlich ihres Stoffwechsels, Morphologie und Genexpression unterscheiden, wurden die Versuche bei identischer Durchführung sowohl mit polarisierten Caco-2- als auch HT-29-Zellen durchgeführt. Beide Zelllinien sind adhärent, jedoch handelt es sich bei HT-29-Zellen um eine Mukus produzierende Zelllinie (Huet *et al.*, 1987).

Untersuchungen zur Zytotoxizität von *B. cereus* ergaben bereits nach 5-7 Minuten einen PI-Einstrom bei 50 % der Zellen, die mit *B. cereus*-Kulturüberständen behandelt wurden (Jessberger *et al.*, 2014). Dieser Einstrom wird durch Porenbildung in der eukaryotischen Zellmembran hervorgerufen, welche durch *B. cereus*-Toxine verursacht werden. Der Nachweis dieser Porenbildung nach 5-7 Minuten korreliert mit dem Ergebnis dieser Arbeit zur mikroskopischen Vitalitätsprüfung der Caco-2-Zellen mittels Trypanblau-Färbung nach Vorbehandlung mit einer enterotoxinhaltigen CGY-Übernachtskultur von *B. cereus* F837/76 für 5-15 Minuten (Abb. 25). Mittels mikroskopischer Auswertung konnte bereits 5 Minuten nach Zugabe der *B. cereus*-Übernachtskultur eine deutliche morphologische Veränderung der Caco-2-Zellen festgestellt werden. Die Blaufärbung der Zellen,

hervorgerufen durch den Trypanblau-Einstrom, verdeutlicht den Verlust der Zellwandintegrität aufgrund der porenbildenden Eigenschaften von *B. cereus* F837/76. Zusätzlich konnte der zytotoxische Effekt der CGY-Übernachtskultur an Caco-2-Zellen durch einen WST-Bioassay bestätigt werden (Abb. 24). Um eine wachstumshemmende Wirkung des toxinbildenden *B. cereus* F837/76 auf *C. sakazakii* ES 5 auszuschließen, wurde zusätzlich das Verhalten beider Pathogene während Ko-Kultivierung in RPMI-Medium, welches im Gentamicinassay verwendet wird, über einen Zeitraum von fünf Stunden untersucht. Interessanterweise lässt sich nach vier Stunden der Ko-Kultivierung eine deutliche Zunahme im Bakterienwachstum sowohl bei *B. cereus* F837/76 als auch bei *C. sakazakii* ES 5 beobachten. Vermutlich finden bereits während dieses Zeitraums stoffwechseldynamische Anpassungsmechanismen statt, die eine Verwertung von Substraten ermöglichen, welche in ausreichender Menge im RPMI 1640-Medium vorliegen. Da dieser deutliche Anstieg des Bakterientiters bei Mono-Kultivierung der beiden Pathogene in RPMI-Medium nicht stattfindet, gilt eine Metabolisierung von sezernierten Abbau- und Zwischenprodukten des ko-kultivierten Partner-Pathogens als wahrscheinlich.

Zur Untersuchung der Kolonisationsfähigkeit von *C. sakazakii* nach Destabilisierung der Zellwandintegrität intestinaler Epithelzellen durch den porenbildenden *B. cereus*-Stamm F837/76 wurde mittels eines Gentamicinassays das Adhäsions-, Invasions-, und intrazelluläre Persistenz- bzw. Proliferationsverhalten nach 7, 24, 48 und 72 Stunden des klinischen Isolates *C. sakazakii* ES 5 evaluiert. Um Rückschlüsse auf einen kolonisationsfördernden bzw. hemmenden Effekt ziehen zu können, wurden die Ergebnisse mit denen eines Standard-Gentamicinassays ohne Vorinkubation mit *B. cereus* F837/76 verglichen. Zur Unterscheidung von *C. sakazakii*- und *B. cereus*-Kolonien auf Festmedium zur CFU-Bestimmung nach Reisolierung aus lysierten eukaryotischen Zellen wurde ein Ampicillin-resistenter *C. sakazakii* ES 5^{Amp}-Stamm verwendet, bei dem der pDiGi-Vektor keinen Einfluss auf das Virulenzverhalten hat. Als *in vitro* Modell dienten ausdifferenzierte Caco-2-Zellen sowie nicht ausdifferenzierte HT-29-Zellen. Die Intensivierung von Zell-Zell-Kontakten durch Ausdifferenzierung der Caco-2-Zellen ermöglicht eine gute Differenzierung in apikale und basolaterale Zellkompartimente und macht sie zu einem sehr guten Modell zur Untersuchung der Invasion (Desin *et al.*, 2009). Nicht ausdifferenzierte HT-29-Zellen unterscheiden sich nicht nur in der Organisation der Zytoskelett-Struktur von Caco-2-Zellen, sondern auch in ihrer Fähigkeit, Mukus zu produzieren, der als physikalische Barriere die intestinalen Epithelzellen vor Adhäsion der

Bakterien schützt und darüber hinaus eine antimikrobielle Wirkung auf das Pathogen hat (Gagnon *et al.*, 2013, Gill *et al.*, 2011). Die zytoprotektiven Eigenschaften des sezernierten Mukus erklären die deutlich niedrigere Invasionsrate von *C. sakazakii* ES 5 in HT-29-Zellen im Vergleich zu den polarisierten Caco-2-Zellen sowohl bei mit *B. cereus* F837/76 vorinkubierten Zellen als auch bei Zellen mit intakter Zellmembran. Dieser protektive Effekt wird zudem durch die Sekretion antimikrobieller Peptide und IgA verstärkt (Gill *et al.*, 2011, McGuckin *et al.*, 2011). In Caco-2-Zellen ist die Invasion von *C. sakazakii* ES 5^{Amp} mit 178 % in mit *B. cereus* F837/76 vorbehandelten Zellen fast 200 mal so hoch wie bei der *C. sakazakii* ES 5^{Amp}-Kontrolle mit 0,91 %. Der hohe Anteil an eingedrungenen Bakterien sowie die intrazelluläre Replikation bedingt demnach die hohe Proliferationsrate nach sieben Stunden Inkubation. Die darauf folgende Abnahme des Bakterientiters nach 24 Stunden Inkubation resultiert vermutlich aus dem Zelltod der eukaryotischen Zelle infolge der Überlastung durch die kontinuierliche intrazelluläre Replikation von *C. sakazakii* ES 5.

Die Virulenz eines fakultativ intrazellulären Bakteriums wie *C. sakazakii* oder *S. Typhimurium* hängt nicht nur von Faktoren ab, welche die Adhäsion und Invasion ermöglichen, sondern auch von der Fähigkeit, in der Zelle zu überleben und zu replizieren. Diese Eigenschaft erfordert metabolische Anpassungsmechanismen, welche durch Faktoren gesteuert werden, die in Abhängigkeit von Umweltbedingungen synthetisiert werden (Eisenreich *et al.*, 2010). Die Abnahme der Bakterienzahl 24 Stunden nach Zugabe der *C. sakazakii* ES 5-Infektionslösung und der darauf folgende starke Anstieg um mehr als 2500 % über einen Zeitraum von bis zu 72 Stunden *p.i.* untermauern die Hypothese, dass es zu bakteriellen Anpassungsreaktionen im Energiestoffwechsel bei *C. sakazakii* ES 5 kommt. Die intrazelluläre Bakterienzahl der ES 5^{Amp}-Kontrolle hingegen erreicht ihren Peak erst nach 24 Stunden und bleibt bis zum Zeitpunkt *t*=72 Stunden *p. i.* konstant. Aufgrund der intakten Caco-2-Zellmembran ist die Invasionsrate bei der ES 5^{Amp}-Kontrolle im Vergleich zu mit porenbildenden Toxinen vorbehandelten Zellen deutlich geringer. Somit befinden sich im Gegensatz zu den mit *B. cereus* F837/76 vorinkubierten Caco-2-Zellen von Anfang an weniger *C. sakazakii* ES 5-Zellen in der eukaryotischen Zelle, sodass sich diese intrazellulär replizieren können, ohne den Zelltod der eukaryotischen Zellen infolge einer Überlastung zu verursachen. Nach 24 Stunden *p.i.* gehen die intrazellulären *C. sakazakii* ES 5-Bakterienzellen schließlich in den persistierenden Zustand über.

Die Invasion in mit *B. cereus* F837/76 vorinkubierten HT-29-Zellen ist mit 0,1 % sogar niedriger als die der *C. sakazakii* ES 5^{Amp}-Kontrolle, jedoch bewirkt die Schädigung der

Zellen eine Erhöhung der intrazellulären Replikation, welche nach sieben Stunden ihren Höhepunkt erreicht. Ein ähnlicher Verlauf ist bei der *C. sakazakii* ES 5^{Amp}-Kontrolle zu erkennen, jedoch liegen die Proliferationsraten deutlich niedriger.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass *B. cereus* einen positiven Effekt auf das Kolonisationsverhalten von *C. sakazakii* ES 5 hat. Da es bisher keine vergleichbaren Studien gibt, müssen die zugrunde liegenden Mechanismen noch identifiziert werden. Die Destabilisierung der Zellwandintegrität durch *B. cereus* F837/76 konnte in zahlreichen Studien belegt und in dieser Arbeit mittels WST-Bioassay, Trypanblau-Färbung und *in vitro*-Modellen bestätigt werden. Fraglich bleibt jedoch, ob die Porenbildung einen direkten Einfluss auf das erhöhte Invasionsverhalten von *C. sakazakii* ES 5 hat, indem das Pathogen die Durchlässigkeit der Pore nutzt, um in die Zelle einzudringen. Aufgrund des Durchmessers der Präpore mit 2,6 nm (Zhu *et al.*, 2016) ist die direkte Passage aufgrund der Größe von *C. sakazakii* mit 3 µm x 1 µm (Farmer *et al.*, 1980) unwahrscheinlich. Die Erhöhung der Zellwandpermeabilität durch die zytotoxische Wirkung von *B. cereus*-Toxinen könnte die erhöhte Invasivität von *C. sakazakii* ES 5 erklären, da Virulenzfaktoren leichter und schneller wirken können. Dies würde auch erklären, warum eine *C. sakazakii* Infektion überwiegend mit Neugeborenen assoziiert wird, da bei dieser Patientengruppe die Permeabilität intestinaler Epithelzellen noch sehr hoch ist (Beach *et al.*, 1982, Rouwet *et al.*, 2002) und die Barrierefunktion der *tight junctions* noch nicht vollständig ausgebildet ist. Zusätzlich sind bei Neugeborenen physiologische Abwehrmechanismen wie die Darmperistaltik, sezernierte proteolytische Enzyme und die antimikrobielle Zusammensetzung des Mukus nicht ausreichend entwickelt, um vor einer Infektion mit pathogenen Mikroorganismen zu schützen (Claud *et al.*, 2001, Claud, 2009).

Der Einfluss von *L. monocytogenes* auf die Virulenz von *C. sakazakii* ES 5 wurde ebenfalls *in vitro* untersucht. Es handelt sich dabei um ein Gram-positives, bewegliches Stäbchen, welches aufgrund seiner hohen Widerstandsfähigkeit gegenüber äußeren Umwelteinflüssen ein großes Problem für die Lebensmittelindustrie darstellt. Als Erreger der Listeriose kann *L. monocytogenes* bei immunkompromittierten Personen, Neugeborenen, älteren Personen und Schwangeren schwerwiegende systemische Infektionen mit ZNS-Beteiligung hervorrufen (Rouquette *et al.*, 1996, Benshushan *et al.*, 2002). Nach der Aufnahme kontaminierter Lebensmittel kommt es zur Adhäsion an intestinale Epithelzellen und zur Induktion eines Reißverschluss (*zipper*-) ähnlichen Internalisierungsprozesses (Ireton *et al.*, 1997). Dabei bewirken Wechselwirkungen zwischen den listeriellen Proteinen Internalin A und Internalin B mit eukaryotischen

Oberflächenstrukturen eine Anhäufung Aktin-regulatorischer Proteine, die zur Umlagerung des Aktinzytoskeletts führen und Plasmamembranausstülpungen, sogenannte *membrane ruffles*, hervorrufen (Pizarro-Cerda *et al.*, 2012). Nach induzierter Phagozytose wird durch Sekretion eines hämolytischen, porenbildenden Toxins, dem Listeriolysin O (LLO), und Phospholipase C (PlcA) die Zerstörung der phagosomalen Membran induziert und das Bakterium ins Zytosol freigesetzt.

Auf Grundlage der bereits detaillierten Charakterisierung der Pathogenese von *L. monocytogenes* und seiner Bedeutung in der Lebensmittelhygiene sollten zum einen Rückschlüsse auf bisher unbekannte Virulenzfaktoren von *C. sakazakii* gezogen und zum anderen der Einfluss der listeriellen Internalisierung auf die Virulenz von *C. sakazakii* ES 5 evaluiert werden. Dazu wurden polarisierte Caco-2-Zellen sowie nicht ausdifferenzierte, Mukus produzierende HT-29-Zellen mit *L. monocytogenes* EGD-*gfp* (MOI=10) für 30 Minuten infiziert. Nach Adhäsion der Listerien an die eukaryotische Zelloberfläche nach 30 Minuten wurden die Epithelzellen zur Entfernung nicht adhärierter Listerien mehrfach gewaschen, mit *C. sakazakii* ES 5 (MOI=10) infiziert und das Adhäsions-, Invasions- und Proliferationsverhalten untersucht. Obwohl die Adhäsionsrate von *C. sakazakii* ES 5 bei mit *L. monocytogenes* EGD-*gfp* vorinkubierten Caco-2-Zellen annähernd mit der des Standard-Gentamicinassays korreliert, ist eine deutlich höhere Invasivität feststellbar. Es ist anzunehmen, dass die Umstrukturierung des Zytoskeletts durch die Internalisierung von *L. monocytogenes* EGD-*gfp* die Invasion von *C. sakazakii* ES 5 begünstigt.

Studien belegen, dass *L. monocytogenes* und *C. sakazakii* bevorzugt über die basolateralen Kompartimente polarisierter Epithelzellen eindringen (Pentecost *et al.*, 2006, Kim and Loessner, 2008). *Tight junctions* verhindern als natürliche Barriere den Kontakt luminaler Mikroorganismen mit der basolateralen Membran. Die Anzahl an *tight junctions* ist in polarisierten Zellen höher als in nicht ausdifferenzierten Zellen. Während des Ausdifferenzierungsprozesses des Epithels kommt es an der basolateralen Membran zur Lokalisation des Transmembranproteins E-cadherin, dessen Anhäufung zur Polarisierung der eukaryotischen Zellen beiträgt. Darüber hinaus dient es als Rezeptor für das listerielle Protein Internalin A (Pentecost *et al.*, 2006). Die zytoskeletalen Umbauprozesse an den *tight junctions* nutzen Listerien, um eine rezeptorvermittelte Invasionskaskade zu induzieren. Da eine Schädigung der *tight junctions* die Invasion von *C. sakazakii* erleichtert (Kim and Loessner, 2008), könnte die Remodellierung der Oberflächenstruktur eukaryotischer Zellen durch *L. monocytogenes* einen synergistischen Effekt auf die Invasivität von *C. sakazakii* haben.

Nach der Invasion in die Caco-2-Zellen erfolgt die Replikation von *C. sakazakii* ES 5 bis sieben Stunden *p. i.*, anschließend persistiert das Bakterium in der Zelle. Die intrazelluläre Ko-Existenz von *L. monocytogenes* EGD-*gfp* und *C. sakazakii* ES 5 wurde bisher noch nicht untersucht. In dieser Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass *C. sakazakii* ES 5 bei intrazellulärer Ko-Existenz mit *L. monocytogenes* EGD-*gfp* nicht in der Lage ist zu replizieren. Ob die Synthese porenbildender Toxine wie Listeriolysin O und Phospholipase C einen inhibitorischen Effekt haben und ob *C. sakazakii* ES 5 und *L. monocytogenes* EGD-*gfp* nach Internalisierung überhaupt gemeinsam in einer intrazellulären Vakuole (primäres Phagosom) vorliegen, muss noch untersucht werden.

Die Invasivität von *C. sakazakii* ES 5 in HT-29-Zellen nach Infektion mit Listerien ist insgesamt deutlich niedriger als in Caco-2-Zellen, was auf die protektive Schutzbarriere des Mukus und seine antimikrobielle Wirkung zurückzuführen ist. Ähnlich wie bei Caco-2-Zellen ist die Invasionsrate von *C. sakazakii* ES 5 in mit *L. monocytogenes* EGD-*gfp* vorinkubierten Zellen höher als bei der *C. sakazakii* ES 5-Kontrolle. Die intrazelluläre Replikation von *C. sakazakii* ES 5 ist nach sieben Stunden der Infektion am höchsten und nimmt dann deutlich ab. Interessanterweise ist diese Entwicklung bei der *C. sakazakii* ES 5-Kontrolle in HT-29-Zellen ebenfalls zu erkennen. Anders als in Caco-2-Zellen, in denen die *C. sakazakii* ES 5-Zellen nach 24 Stunden in der Wirtszelle persistieren, nimmt die Bakterienzahl in HT-29-Zellen kontinuierlich ab. Offenbar ist *C. sakazakii* ES 5 unabhängig von der Ko-Existenz mit *L. monocytogenes* EGD-*gfp* weniger gut an das Überleben in HT-29-Zellen als in Caco-2-Zellen adaptiert.

Nachdem der positive Effekt einer Vorinkubation von *B. cereus* F837/76 mit der Wirtszelle auf die Virulenz von *C. sakazakii* ES 5 nachgewiesen werden konnte, wurde zusätzlich der Einfluss einer gleichzeitigen Infektion mit *L. monocytogenes* EGD-*gfp* und *C. sakazakii* ES 5 nach Vorbehandlung der Epithelzellen mit *B. cereus* F837/76 auf die Invasivität von *C. sakazakii* ES 5 untersucht. Interessanterweise war die Invasivität der Pathogene *C. sakazakii* ES 5 und *L. monocytogenes* EGD-*gfp* deutlich höher bei der Ko-Infektion als bei den mitgeführten Kontrollansätzen. Die Erhöhung der Invasionsrate um den Faktor sechs bei *L. monocytogenes* EGD-*gfp* bzw. um den Faktor acht bei *C. sakazakii* ES 5 nach Vorbehandlung der Caco-2-Zellen mit einer *B. cereus*-Übernachtskultur bestätigt zum Einen das Ergebnis, dass die Invasion von *C. sakazakii* ES 5 durch die Destabilisierung der Zellwandintegrität begünstigt wird und verdeutlicht zum anderen, dass auch *L. monocytogenes* EGD-*gfp* von einer Destabilisierung der Zellmembran profitiert. Bei der Ko-Infektion in HT-29-Zellen konnten keine *C. sakazakii* ES 5-Zellen reisoliert

werden. Im Gegensatz dazu betrug die Invasionsrate von *L. monocytogenes* EGD-*gfp* 1,08 %. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass *C. sakazakii* ES 5 und *L. monocytogenes* EGD-*gfp* über unterschiedliche Invasionsmechanismen verfügen. Diese Hypothese erhärtet sich durch die Feststellung, dass die Kontrolle von *L. monocytogenes* EGD-*gfp* (0,15 %) eine 10-fach höhere Invasionsrate aufweist, als die Kontrolle von *C. sakazakii* ES 5 (0,01 %) (Abb. 29).

2.2. Die Rolle von probiotischen Milchsäurebakterien während der Wirtskolonisation von *C. sakazakii*

Da Milchsäurebakterien (*Lactic Acid Bacteria*; LAB) grundsätzlich als sicher gelten und einen GRAS („*Generally Recognized As Safe*“)-Status besitzen, sind sie insbesondere für die Lebensmittelindustrie von großem Interesse (Altuntas, 2013). Kritiker bezweifeln jedoch die Sicherheit von Probiotika, da die unzureichende Datenlage klinischer Studien keine Prognose über die Unbedenklichkeit von Probiotika zulässt (DGKJ *et al.*, 2009). Ferner gibt es bisher noch keine konkreten Empfehlungen zur wirksamen und unbedenklichen Art, Dosierung und Dauer der Anwendung sowie Aussagen über das Risiko einer Probiotika induzierten Infektion beim Neugeborenen als Risikogruppe (Boyle *et al.*, 2006). In umfangreichen *in vitro* Studien wurde die Wirksamkeit von probiotischen Stämmen gegen enteropathogene Keime mit dem Ziel untersucht, die probiotischen Eigenschaften zu identifizieren und ihre Rolle innerhalb des intestinalen Mikrobioms näher zu charakterisieren. Es wird angenommen, dass probiotische Mikroorganismen durch vielfältige Mechanismen eine inhibitorische Wirkung auf Pathogene haben: Durch Senkung des luminalen pH-Werts, Sekretion von Bakteriocinen, Bildung einer physikalischen Barriere durch Aggregatbildung mit dem Pathogen und Stimulation der Defensin-Produktion epithelialer Zellen (Sartor, 2005, Corr *et al.*, 2007, Collado *et al.*, 2007). Campana *et al.* (2017) analysierten den Effekt von insgesamt drei LAB-Stämmen, darunter auch *L. rhamnosus*, auf die Invasivität der enteropathogenen Keime *S. enteritidis*, *C. jejuni*, *L. monocytogenes*, *E. coli* und *C. sakazakii* an ausdifferenzierten Caco-2-Zellen. Sie kamen zu dem Ergebnis, dass alle LAB-Stämme einen inhibitorischen Effekt auf die Invasivität der enteropathogenen Keime haben (Campana *et al.*, 2017). In dieser Studie wurde zudem der Effekt einer Vorbehandlung der Caco-2-Zellen mit Probiotika mit dem einer gleichzeitigen Infektion auf die Invasivität der Pathogene gegenübergestellt. Entgegen den Ergebnissen dieser Arbeit war die Invasivität von *C. sakazakii* bei gleichzeitiger Infektion mit *L. rhamnosus* weniger stark gehemmt als bei der vorangehenden Vorinkubation der Caco-2-Zellen mit probiotischen *Lactobacillus*-

Stämmen und anschließender *C. sakazakii*-Infektion. Da sich die Versuchsdurchführung dieser Arbeit mit der von Campana *et al.* zum einen in der Verwendung unterschiedlicher *C. sakazakii*- und *L. rhamnosus*-Stämme und zum anderen in der Dauer der Vorbehandlung (1 h vs. 2 h) unterscheidet, sind diese beiden Variablen bei der Interpretation der Ergebnisse besonders zu berücksichtigen. Darüber hinaus ist die Fähigkeit zur Aggregatbildung und kompetitiven Hemmung an der Wirtszelloberfläche stammspezifisch, da sie von der Synthese spezifischer Oberflächenmolekülen, die entweder als Liganden zur Bindung der Pathogene oder als Adhäsine zur Bindung an Epithelzellen fungieren, abhängig ist (Sengupta *et al.*, 2013).

In dieser Arbeit wurde die Adhäsions- und Invasionsfähigkeit von *C. sakazakii* ES 5 sowohl nach Vorinkubation der Epithelzellen mit Probiotika als auch bei gleichzeitiger Infektion mit Probiotika und Pathogen untersucht, um Rückschlüsse auf den Inhibitionsmechanismus zu ziehen. Auffällig war, dass die Adhäsionsfähigkeit von *C. sakazakii* ES 5 an ausdifferenzierten Caco-2- und Mukus produzierenden HT-29-Zellen bei Vorbehandlung der Epithelzellen mit *L. casei*, *L. rhamnosus* oder *L. helveticus* (MOI=100) für zwei Stunden, um bis zu 166 % erhöht war. Im Gegensatz dazu war die Adhäsionsrate bei gleichzeitiger Infektion deutlich niedriger als die des Kontrollansatzes. Diese Feststellung deutet darauf hin, dass die probiotischen *Lactobacillus*-Stämme eine mechanische Barriere auf der Oberfläche der eukaryotischen Zellen bilden, an die *C. sakazakii* ES 5 scheinbar besser adhärieren kann als an unbehandelte Epithelzellen. Im Gegensatz dazu scheint bei der gleichzeitigen Infektion mit Probiotika und *C. sakazakii* ES 5 die höhere Bakterienkonzentration an Probiotika (MOI=100) dazu zu führen, dass *C. sakazakii*-Zellen (MOI=10) während des Adhäsionsprozesses an die Wirtszelle verdrängt werden, wodurch eine geringere Adhäsionsrate als beim Kontrollansatz zu beobachten ist. Zusätzlich ist es möglich, dass freie, nicht adhärierte *Lactobacillus*-Zellen die Adhäsion von *C. sakazakii* ES 5 an *Lactobacillus*-Zellen, die bereits an die eukaryotische Zelle gebunden sind, hemmen. Diese Adhäsionshemmung wird beim Ansatz mit Vorinkubation der Epithelzellen mit Probiotika durch mehrere Waschschrte vor der Infektion mit *C. sakazakii* ES 5 verhindert, wodurch eine höhere Adhäsionsrate von *C. sakazakii* ES 5 zu beobachten ist.

Der negative Effekt von probiotischen *Lactobacillus*-Stämmen auf die Invasivität von *C. sakazakii* ES 5 wird dadurch deutlich, dass trotz der erhöhten Adhäsion bei der Vorinkubation der eukaryotischen Zellen mit Probiotika, die Invasion von *C. sakazakii* ES 5 deutlich reduziert wird. So konnten die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die

Invasivität von *C. sakazakii* ES 5 durch Vorbehandlung mit probiotischen *Lactobacillus*-Stämmen in Caco-2- um 90 % bis 99,4 %, in HT-29-Zellen um 80 % bis 93,2 % reduziert wird (Abb. 33). Die Effektivität der Hemmung weist dabei speziesspezifische Unterschiede auf, die in Abhängigkeit der Zelllinie variieren. So ist die Hemmung von *L. casei* mit bis zu 99,4 % in ausdifferenzierten Caco-2-Zellen am stärksten, in HT-29-Zellen mit 79,7 % jedoch schwächer im Vergleich zu *L. rhamnosus* und *L. helveticus*.

Untersuchungen zur Invasivität von *L. monocytogenes* nach probiotischer Vorbehandlung intestinaler Epithelzellen (C2Bbe1) konnten ebenfalls eine signifikante Reduzierung der listeriellen Invasion von 60 % bis 90 % feststellen (Corr *et al.*, 2007). Auf Grundlage ihrer Ergebnisse postulierten sie daraufhin, dass der probiotische Effekt durch die Interaktion sekretierter Komponenten mit dem epithelialen Monolayer mediiert wird und nicht durch Wechselwirkungen mit dem Pathogen hervorgerufen wird. Diese Hypothese wird durch Studien untermauert, die zu dem Ergebnis kamen, dass Probiotika die Synthese von Transmembran- und *tight junction* Proteine forcieren, welche die Zellwandintegrität verstärken und die bakterielle Translokation hemmen (Qin *et al.*, 2005, Shen *et al.*, 2006). Darüber hinaus verstärken Probiotika die Immunantwort der Wirtszelle, indem sie die Synthese der antiinflammatorischen Zytokine IL-10 induzieren, die Synthese proinflammatorischer Interferon- γ senken und die IgA-Sekretion stimulieren (Fukushima *et al.*, 1998, Di Giacinto *et al.*, 2005).

Die Tatsache, dass bei gleichzeitiger Infektion von *C. sakazakii* ES 5 und probiotischen *Lactobacillus*-Stämmen die Invasion in ausdifferenzierte Caco-2-Zellen vollständig und in HT-29-Zellen fast vollständig inhibiert wird, führt zu der Annahme, dass nicht nur die Induktion zellulärer Abwehrmechanismen eine Rolle spielt, sondern auch die Sekretion antimikrobieller Substanzen, welche beim Ansatz mit probiotischer Vorinkubation der Epithelzellen durch Waschschrte vor der Zugabe von *C. sakazakii* ES 5 entfernt und somit eine untergeordnete Rolle spielen. Die antimikrobielle Aktivität von Probiotika wurde zusätzlich in einem Wachstumstest in RPMI-Medium über die Dauer eines Standard-Gentamicinassays (2,5 Stunden) evaluiert. Aufgrund der deutlichen CFU-Abnahme von *C. sakazakii* ES 5 bei Ko-Kultivierung mit den probiotischen *Lactobacillus*-Stämmen *L. casei*, *L. rhamnosus* oder *L. helveticus* um zwei bis drei log-Stufen innerhalb von 1,5 Stunden, ist die Sekretion antimikrobieller Substanzen durch die probiotischen *Lactobacillus*-Stämme in Betracht zu ziehen. Diese Feststellung würde auch den inhibitorischen Effekt auf die Invasion in die eukaryotischen Zellen vor Gentamicin-Zugabe zum Zeitpunkt 1,5 Stunden *p. i.* erklären. Die antimikrobielle Aktivität kann

sowohl auf der Produktion von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) als auch auf der Sekretion von Bakteriocinen basieren (Jacobsen *et al.*, 1999, Awaishah *et al.*, 2013). Zur Verifizierung der antimikrobiellen Eigenschaften der in dieser Arbeit verwendeten probiotischen *Lactobacillus*-Stämme wurde zusätzlich das *spot on the lawn*-Verfahren nach Jacobsen *et al.* (1999) durchgeführt, bei dem probiotisches Kulturmateriel mit einer *C. sakazakii* ES 5-Übernachtskultur oder mit einer Tagkultur, deren Anzuchtbedingungen mit denen im Gentamicinassay vergleichbar sind, überschichtet und der Hemmhof nach 24 Stunden Inkubation gemessen wird. Da bei allen drei probiotischen *Lactobacillus*-Stämmen ein inhibitorischer Effekt auf das Wachstum von *C. sakazakii* ES 5 festzustellen war, korrelieren diese Ergebnisse nicht nur mit denen der Ko-Kultivierung in RPMI-Medium, sondern auch mit denen aus anderen Studien (Campana *et al.*, 2017). Dieses Ergebnis zeigt auch, dass das Wachstum von Bakterien durch Probiotika auch während des Infektionsprozesses gehemmt werden kann.

Diese Feststellung gab Anlass dazu, den Einsatz von Probiotika in PIF zu untersuchen, da *Cronobacter* bereits während der Rekonstitution, der Nahrungsaufnahme bzw. während der Passage des Gastrointestinaltraktes, der inhibitorischen Wirkung von Probiotika ausgesetzt werden würde.

Obwohl die Wirkeffizienz Bakteriocin-produzierender Mikroorganismen *in vitro* belegt ist, gibt es bisher keine eindeutige Aussage über die Zusammensetzung der Bakteriocine und deren Wechselwirkung mit dem Pathogen. Aufgrund der Schwierigkeit, die bakteriocine Wirkung quantitativ und qualitativ bestimmen zu können, konnte die Rolle von Bakteriocinen im Intestinaltrakt des Menschen noch nicht charakterisiert werden (Flynn *et al.*, 2002). Sicherlich spielen Bakteriocine eine große Rolle, doch auch die Sekretion von Milch- und Essigsäure und die damit verbundene pH-Wert-Absenkung des Milieus, werden als Ursache für die antimikrobielle Aktivität diskutiert.

In dieser Arbeit wurde daher die bakteriocine Wirkung in Abhängigkeit des pH-Wertes und der Hitzestabilität überprüft, indem die probiotischen Überstände von *Lactobacillus*-Stämmen auf einen neutralen pH-Wert von 7 eingestellt bzw. bei 121°C für 15 Minuten autoklaviert wurden. Basierend auf den Ergebnissen der *in vitro* Untersuchungen konnte eine pH-Wert-abhängige inhibitorische Wirkung probiotischer Überstände bei der Adhäsion von *C. sakazakii* ES 5 an eukaryotische Zellen festgestellt werden, da die Adhäsionsraten an Epithelzellen, die mit neutralisierten Probiotika-Überständen vorbehandelt wurden, höher waren als die Adhäsionsraten an Epithelzellen, die mit

unbehandelten bzw. hitzebehandelten Überständen vorinkubiert wurden. Dieser Effekt wirkt sich ebenfalls auf die Invasivität von *C. sakazakii* ES 5 aus, da die Raten mit 9,8 % bis 11,1 % in Caco-2-Zellen und mit 0,03 % bis 0,04 % in HT-29-Zellen in Abhängigkeit des verwendeten probiotischen *Lactobacillus*-Stamms zwar niedriger als die der *C. sakazakii* ES 5-Kontrolle waren, aber im Vergleich zum Einsatz von unbehandelten und hitzebehandelten probiotischen Überständen höher waren.

Diese pH-Wert-Abhängigkeit wurde auch von Awaishah *et al.* (2013) beschrieben. Sie stellten fest, dass eine pH-Wert-Erhöhung in den Überständen von *L. casei* und *L. acidophilus* auf 6,5 zu einer Verringerung des antimikrobiellen Effekts führte (Awaishah *et al.*, 2013). Darüber hinaus stellten sie fest, dass die antimikrobielle Aktivität der Überstände durch eine Hitzebehandlung bei 60°C oder 80°C für 10 Minuten oder 2 Stunden vollkommen aufgehoben wird. Die Ergebnisse dieser Arbeit konnten jedoch eindeutig zeigen, dass autoklavierte (121°C) *Lactobacillus*-Überstände durchaus einen inhibitorischen Effekt auf die Invasivität von *C. sakazakii* ES 5 haben. Somit können die in dieser Arbeit verwendeten Bakteriocine von *L. casei*, *L. helveticus* und *L. rhamnosus* als hitzestabil charakterisiert werden oder benötigen eine längere Hitzeinaktivierung, was in weiteren Studien untersucht werden soll.

Aufgrund der Tatsache, dass *C. sakazakii* über einen langen Zeitraum in PIF überleben kann, mittels Standardnachweisverfahren evtl. nicht zu detektieren ist und eine hohe Tenazität gegenüber antimikrobiellen Substanzen hat, stellt dieses Bakterium eine große Herausforderung für die Sicherstellung der Lebensmittelhygiene dar. Die Entwicklung von Strategien zur Prophylaxe und Bekämpfung einer *C. sakazakii*-Kontamination ist somit von großer Bedeutung für die Sicherstellung eines mikrobiologisch einwandfreien Produktes.

Um mögliche Ansätze eines sicheren und wirksamen Einsatzes von Bakteriocinen zu schaffen, wurde in dieser Arbeit der Effekt steriler, hitzebehandelter Überstände von *L. casei*, *L. rhamnosus* und *L. helveticus* auf das Wachstum von *C. sakazakii* ES 5 in verschiedenen Nahrungstypen aus den Produktgruppen Anfangsmilch, Folgemilch und Grießbrei untersucht. Nachdem in dieser Arbeit der inhibitorische Effekt probiotischer, hitzebehandelter Überstände auf die Invasivität von *C. sakazakii* ES 5 *in vitro* nachgewiesen wurde, konnte auch in Säuglingsnahrung eine deutliche Wachstumsinhibition von *C. sakazakii* ES 5 festgestellt werden. Um eine Aussage über die Signifikanz treffen zu können, bedarf es allerdings eines umfangreicheren

Probensortiments. Im Vergleich zu Produkten auf Milchbasis war der Hemmeffekt in Grießbrei bei allen verwendeten probiotischen Überständen geringer. Da Pflanzen ein natürliches Reservoir für *C. sakazakii* darstellen (Jaradat *et al.*, 2009), bieten Lebensmittel auf Pflanzenbasis, wie Grießbrei, ideale Wachstumsbedingungen für das Pathogen. Untersuchungen zur Kolonisation von Pflanzen konnten demonstrieren, dass *C. sakazakii* in der Lage ist, die Wurzeln (Rizosphäre) von Tomatenpflanzen zu besiedeln und darüber hinaus internalisiert über einen längeren Zeitraum zu persistieren (Schmid *et al.*, 2009).

Basierend auf den Ergebnissen dieser Arbeit, bei dem der inhibitorische Effekt sowohl auf das Wachstum von *C. sakazakii* ES 5 in PIF als auch auf die Invasivität in epitheliale Intestinalzellen festgestellt wurde, konnten mögliche Ansätze eines sicheren und wirksamen Einsatzes von sterilen Bakteriocinen in PIF geschaffen werden. Bis zum kommerziellen Einsatz in Säuglingsnahrung bedarf es jedoch noch umfangreicher Untersuchungen zur Verträglichkeit von Bakteriocinen, Entstehung von Resistenzen und organoleptischen Anforderungen, um eine Ablehnung der Nahrung durch geschmackliche Beeinträchtigungen des Produktes auszuschließen.

3. Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit konnten die Bedeutung des Biofilms sowohl für das Überleben von *C. sakazakii* in der Umwelt als auch im Wirtsorganismus demonstrieren. Es wurden die Einflussfaktoren der Biofilmbildung identifiziert, die biochemische Zusammensetzung der Biofilmmatrix charakterisiert und die Rolle der beiden Subpopulationen im Biofilm (Aggregatzellen und planktonische Zellen) in der Virulenz einerseits und für das Überleben unter dem Stressfaktor Austrocknung andererseits, gezeigt.

Die genetische Regulation dieser funktionalen Auftrennung in die beiden Subpopulation Aggregatzellen und planktonische Zellen während der Biofilmbildung, ihre Auswirkung auf die Expression von Virulenzgenen und die Synthese von Polysacchariden zur Bildung und zum Erhalt des Biofilms gilt es jedoch noch zu klären.

Darüber hinaus wurde im Rahmen dieser Arbeit die Reaktivierung und Invasivität von *C. sakazakii*-Zellen im VBNC-Zustand gezeigt. Ein interessanter Ansatz zur Prävention einer Infektion mit VBNC-Zellen wäre der Einsatz humanisierter, gegen LPS als Antigen gerichteter, LPS-Antikörper in PIF. Hierzu müsste neben der Wirksamkeit in PIF, auch die unter Magen-Darm-Bedingungen untersucht werden.

Weiterhin wurde in dieser Arbeit zum einen der positive Einfluss von pathogenen und zum anderen der hemmende Effekt von probiotischen Bakterien auf die Invasivität von *C. sakazakii* ES 5 gezeigt. In diesem Zusammenhang bleibt noch zu klären, welche Mechanismen bei der Ko-Infektion mit den Gram-positiven Pathogenen *L. monocytogenes* und *B. cereus* das Eindringen von *C. sakazakii* in die Wirtszelle begünstigen.

Auf der anderen Seite ist die Charakterisierung der antimikrobiellen Substanzen von probiotischen *Lactobacillus*-Stämmen für die Entwicklung prophylaktischer Ansätze zum sicheren und wirksamen Einsatz dieser Zusätze in PIF notwendig.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Cronobacter sakazakii ist ein Gram-negatives Bakterium, das durch sein Vorkommen in pulverförmiger Säuglingsnahrung (PIF) schwerwiegende Erkrankungen beim Neugeborenen auslösen kann.

Die Fähigkeit zur Biofilmbildung erhöht die Resistenz des Pathogens gegenüber äußeren Umwelteinflüssen und stellt somit ein großes Problem für die Lebensmittelindustrie dar, da Reinigungs- und Desinfektionsmaßnahmen eine Kontamination mit *C. sakazakii* häufig nicht verhindern können. Zwar besteht für *Cronobacter* spp. eine Korrelation zwischen der Biofilmbildung und der Persistenz außerhalb des Wirts, jedoch konnte bisher noch keine Verbindung zu seiner Virulenz festgestellt werden.

Aus diesem Grund wurden insgesamt 20 *C. sakazakii*-Stämme unterschiedlicher Herkunft hinsichtlich ihrer Biofilmbildung unter verschiedenen Bedingungen phänotypisch charakterisiert. Basierend auf den unterschiedlichen phänotypischen Biofilmeigenschaften wurden drei *C. sakazakii*-Stämme ausgewählt, ihre Biofilmbildung quantifiziert, biochemisch analysiert und ihre Virulenz im Zellkulturmodell untersucht. Um Hinweise über die Mechanismen während der Biofilmbildung zu erhalten, wurden die Untersuchungen gleichzeitig mit den *wzx*-Mutanten derselben Stämme durchgeführt, die kein LPS mehr produzierten.

Bei der phänotypischen Charakterisierung der Biofilmbildung konnte festgestellt werden, dass die Fähigkeit zur Biofilmbildung innerhalb der Spezies *C. sakazakii* stark variiert und von Umweltfaktoren wie der Temperatur, dem Nährstoffangebot und der Oberflächenstruktur beeinflusst wird. Die Biofilmbildung war bei Umweltisolaten deutlich ausgeprägter als bei klinischen Isolaten, was die Bedeutung des Biofilms für das Überleben der Bakterien in der Umwelt bestätigt. Die biochemische Analyse der extrazellulären, polysaccharidhaltigen Biofilmmatrix ergab einen hohen Anteil an sezernierten Exopolysacchariden (EPS), wobei mittels Auftrennung in zellgebundene und extrazelluläre EPS der Nachweis einer Kapsel gelang. Zudem konnte die Produktion von Zellulose als Bestandteil der Biofilmmatrix identifiziert werden.

Das Ergebnis der Infektionsversuche ergab, dass die Bakterienzellen aus dem Biofilm (Aggregate) im Vergleich zu den planktonischen Zellen in ihrer Invasivität attenuiert waren. In diesem Zusammenhang konnte auch festgestellt werden, dass Aggregatzellen unter dem Stressfaktor Austrocknung früher in den VBNC-Zustand übergehen als die

planktonischen Zellen, jedoch ihre Invasivität nach dem Reaktivierungsprozess im Gegensatz zu den planktonischen Zellen vermindert war. Weiterhin wurde Katalase als Faktor identifiziert, der die Reaktivierung der VBNC-Zellen in den kultivierbaren Zustand induziert. Da das Enzym von eukaryotischen Zellen sezerniert wird, kommt es sowohl in der Milch als auch im Magen-Darm-Trakt vor, sodass die Reaktivierung bereits während der Rekonstitution in der Milch oder nach Verabreichung der Nahrung im Verdauungstrakt des Neugeborenen induziert und eine Infektion begünstigt wird.

Weiterhin wurde in dieser Arbeit der Einfluss pathogener und probiotischer Bakterien auf das Wachstum und die Virulenz von *C. sakazakii* untersucht. Im Zellkulturmodell zeigte sich, dass die Ko-Infektion mit *B. cereus* bzw. *L. monocytogenes* die Invasion von *C. sakazakii* ES 5 begünstigte, wohingegen die Ko-Infektion mit probiotischen Mikroorganismen einen gegenteiligen Effekt erzielte und die eukaryotischen Epithelzellen vor dem Eindringen des Pathogens schützte. Anhand weiterführender Untersuchungen wurde in dieser Arbeit festgestellt, dass die Sekretion antimikrobieller Substanzen sowie die Absenkung des pH-Wertes durch probiotische Laktobazillen die Invasivität von *C. sakazakii* hemmte. Zusätzlich gelang in dieser Arbeit die Etablierung möglicher Ansätze für einen wirksamen und sicheren Einsatz von Probiotika in PIF, da der Zusatz steriler Überstände von probiotischen *Lactobacillus*-Kulturen zu verschiedener Säuglingsnahrung, wie Anfangsmilch, Folgemilch und Brei einen inhibitorischen Effekt auf das Wachstum von *C. sakazakii* ES 5 erzielte.

VII. SUMMARY

Cronobacter sakazakii is a gram-negative bacterium that can cause severe neonatal diseases due to its occurrence in powdered infant formula (PIF).

The ability to form biofilm increases the resistance of the pathogen to external environmental influences and poses therefore a major problem for the food industry, since cleaning and disinfecting measures often cannot prevent the contamination with *C. sakazakii*. For *Cronobacter* spp. a correlation between biofilm formation and persistence outside the host has already been reported, however, no connection to its virulence has yet been established.

For this reason a total of 20 *C. sakazakii* strains of different sources were phenotypically characterized in their biofilm formation under various conditions. Based on the different phenotypic biofilm characteristics, three *C. sakazakii* strains were selected, their biofilm formation quantified, biochemically analyzed and their virulence examined performing a gentamicin protection assay. To obtain information on the mechanisms during biofilm formation, the studies were carried out simultaneously with the *wzx*-mutants of the same strains that did not produce LPS.

In the phenotypic biofilm characterization it was found that the ability to form biofilm within the species *C. sakazakii* varies widely and is influenced by environmental factors such as temperature, nutrient supply and surface structure. Biofilm formation was much more pronounced in environmental isolates than in clinical isolates, which confirms the importance of biofilm for the survival of the bacteria in the environment. The biochemical analysis of the extracellular polysaccharide-containing biofilm matrix revealed a high amount of secreted exopolysaccharides (EPS), whereby the detection of a capsule was achieved by separation into cell-bound and extracellular EPS. In addition the production of cellulose as a component of the biofilm matrix was identified.

The result of the gentamicin protection assay showed that the bacterial cells from the biofilm (aggregates) were attenuated in their invasivity compared to the planktonic cells. In this context it was also found that aggregates under the stress factor dehydration earlier enter into the VBNC state than the planktonic cells, but their invasiveness after resuscitation was reduced in contrast to the planktonic cells. Furthermore catalase was identified as a factor which induces the resuscitation of the VBNC state into the culturable state.

Since this enzyme is secreted by eukaryotic cells, it occurs both in the milk and in the gastrointestinal tract, so that the resuscitation is already induced during the reconstitution of PIF or after its administration in the digestive tract of the newborn so that an infection is facilitated.

Furthermore the influence of pathogenic and probiotic bacteria on the growth and virulence of *C. sakazakii* was investigated in this study. Performing a gentamicin protection assay it was shown that the co-infection with *B. cereus* and *L. monocytogenes* facilitated the invasion of *C. sakazakii* ES 5, whereas the co-infection with probiotic microorganisms produced a contrary effect and protected the eukaryotic epithelial cells from the penetration of the pathogen. On the basis of further studies, it was found in this work that the secretion of antimicrobial substances and the lowering of the pH value by probiotic *Lactobacillus* inhibited the invasiveness of *C. sakazakii*.

Additionally the establishment of possible approaches for the effective and safe use of probiotics in PIF was achieved, since the addition of sterile supernatants from probiotic *Lactobacillus* cultures to different infant nutrition such as initial milk, follow up formula and plant-based baby food (mash) has an inhibitory effect on the growth of *C. sakazakii* ES 5.

VIII. LITERATURVERZEICHNIS

ABBASIFAR, R., KROPINSKI, A. M., SABOUR, P. M., CHAMBERS, J. R., MACKINNON, J., MALIG, T. & GRIFFITHS, M. W. (2014):

Efficiency of bacteriophage therapy against *Cronobacter sakazakii* in *Galleria mellonella* (greater wax moth) larvae.

Archives of Virology. 159, 2253-2261.

ALTUNTAS, E. G. (2013):

Bacteriocins: A natural way to combat with pathogens.

In: *Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education*. Formatex. Badajoz, Spanien, 1005-1015

ALVAREZ-ORDONEZ, A., BEGLEY, M. & HILL, C. (2012):

Polymorphisms in *rpoS* and stress tolerance heterogeneity in natural isolates of *Cronobacter sakazakii*.

Applied and Environmental Microbiology. 78, 3975-3984.

ALVAREZ-ORDONEZ, A., CUMMINS, C., DEASY, T., CLIFFORD, T., BEGLEY, M. & HILL, C. (2014):

Acid stress management by *Cronobacter sakazakii*.

International Journal of Food Microbiology. 178, 21-28.

AWAISHEH, S. S., AL-NABULSI, A. A., OSAILI, T. M., IBRAHIM, S. & HOLLEY, R. (2013):

Inhibition of *Cronobacter sakazakii* by heat labile bacteriocins produced by probiotic LAB isolated from healthy infants.

Journal of Food Science. 78, 1416-1420.

BAFFONE, W., CITTERIO, B., VITTORIA, E., CASAROLI, A., CAMPANA, R., FALZANO, L. & DONELLI, G. (2003):

Retention of virulence in viable but non-culturable halophilic *Vibrio* spp.

International Journal of Food Microbiology. 89, 31-39.

BALDWIN, A., LOUGHLIN, M., CAUBILLA-BARRON, J., KUCEROVA, E., MANNING, G., DOWSON, C. & FORSYTHE, S. (2009):

Multilocus sequence typing of *Cronobacter sakazakii* and *Cronobacter malonaticus* reveals stable clonal structures with clinical significance which do not correlate with biotypes.

BMC Microbiology. 9, 223.

BAR-OZ, B., PREMINGER, A., PELEG, O., BLOCK, C. & ARAD, I. (2001):

Enterobacter sakazakii infection in the newborn.

Acta Paediatrica. 90, 356-358.

BARRON, J. C. & FORSYTHE, S. J. (2007):

Dry stress and survival time of *Enterobacter sakazakii* and other *Enterobacteriaceae* in dehydrated powdered infant formula.

Journal of Food Protection. 70, 2111-2117.

- BAUMGARTNER, A., GRAND, M., LINIGER, M. & IVERSEN, C. (2009):
Detection and frequency of *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*) in different categories of ready-to-eat foods other than infant formula.
International Journal of Food Microbiology. 136, 189-192.
- BEACH, R. C., MENZIES, I. S., CLAYDEN, G. S. & SCOPES, J. W. (1982):
Gastrointestinal permeability changes in the preterm neonate.
Archives of Disease in Childhood. 57, 141-145.
- BECKER, H., SCHALLER, G., VON WIESE, W. & TERPLAN, G. (1994):
Bacillus cereus in infant foods and dried milk products.
International Journal of Food Microbiology. 23, 1-15.
- BEECHER, D. J. & MACMILLAN, J. D. (1990):
A novel bicomponent hemolysin from *Bacillus cereus*.
Infection and Immunity. 58, 2220-2227.
- BEECHER, D. J. & MACMILLAN, J. D. (1991):
Characterization of the components of hemolysin BL from *Bacillus cereus*.
Infection and Immunity. 59, 1778-1784.
- BENSHUSHAN, A., TSAFRIR, A., ARBEL, R., RAHAV, G., ARIEL, I. & ROJANSKY, N. (2002):
Listeria infection during pregnancy: a 10 year experience.
Israel Medical Association Journal. 4, 776-780.
- BfR (2015):
Säuglingsanfangs- und Folgenahrung: Gesundheitlicher Nutzen von probiotischen Zusätzen ist nicht belegt
Bundesinstitut für Risikobewertung (Stellungnahme Nr. 025/2015 des BfR vom 14. August 2015).
1-31.
- BIERING, G., KARLSSON, S., CLARK, N. C., JONSDOTTIR, K. E., LUDVIGSSON, P. & STEINGRIMSSON, O. (1989):
Three cases of neonatal meningitis caused by *Enterobacter sakazakii* in powdered milk.
Journal of Clinical Microbiology. 27, 2054-2056.
- BISCHOFBERGER, M., IACOVACHE, I. & VAN DER GOOT, F. G. (2012):
Pathogenic pore-forming proteins: function and host response.
Cell Host Microbe. 12, 266-275.
- BLAZKOVA, M., JAVURKOVA, B., VLACH, J., GOSELOVA, S., KARAMONOVA, L., OGRODZKI, P., FORSYTHE, S. & FUKAL, L. (2015):
Diversity of O Antigens within the Genus *Cronobacter*: from Disorder to Order.
Applied and Environmental Microbiology. 81, 5574-5582.
- BOURLIEU, C., MENARD, O., BOUZERZOUR, K., MANDALARI, G., MACIERZANKA, A.,

MACKIE, A. R. & DUPONT, D. (2014):

Specificity of infant digestive conditions: some clues for developing relevant *in vitro* models.
Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 54, 1427-1457.

BOWEN, A. B. & BRADEN, C. R. (2006):

Invasive *Enterobacter sakazakii* disease in infants.
Emerging Infectious Diseases. 12, 1185-1189.

BOYLE, R. J., ROBINS-BROWNE, R. M. & TANG, M. L. (2006):

Probiotic use in clinical practice: what are the risks?
American Journal of Clinical Nutrition. 83, 1256-1264.

BRADY, C., CLEENWERCK, I., VENTER, S., COUTINHO, T. & DE VOS, P. (2013):

Taxonomic evaluation of the genus *Enterobacter* based on multilocus sequence analysis (MLSA): proposal to reclassify *E. nimipressuralis* and *E. amnigenus* into *Lelliottia* gen. nov. as *Lelliottia nimipressuralis* comb. nov. and *Lelliottia amnigena* comb. nov., respectively, *E. gergoviae* and *E. pyrinus* into *Pluralibacter* gen. nov. as *Pluralibacter gergoviae* comb. nov. and *Pluralibacter pyrinus* comb. nov., respectively, *E. cowanii*, *E. radicincitans*, *E. oryzae* and *E. arachidis* into *Kosakonia* gen. nov. as *Kosakonia cowanii* comb. nov., *Kosakonia radicincitans* comb. nov., *Kosakonia oryzae* comb. nov. and *Kosakonia arachidis* comb. nov., respectively, and *E. turicensis*, *E. helveticus* and *E. pulveris* into *Cronobacter* as *Cronobacter zurichensis* nom. nov., *Cronobacter helveticus* comb. nov. and *Cronobacter pulveris* comb. nov., respectively, and emended description of the genera *Enterobacter* and *Cronobacter*.

Systematic and Applied Microbiology. 36, 309-319.

BREEUWER, P., LARDEAU, A., PETERZ, M. & JOOSTEN, H. M. (2003):

Desiccation and heat tolerance of *Enterobacter sakazakii*.
Journal of Applied Microbiology. 95, 967-973.

BURITI, F. C., CASTRO, I. A. & SAAD, S. M. (2010):

Viability of *Lactobacillus acidophilus* in synbiotic guava mousses and its survival under *in vitro* simulated gastrointestinal conditions.
International Journal of Food Microbiology. 137, 121-129.

CAMPANA, R., VAN HEMERT, S. & BAFFONE, W. (2017):

Strain-specific probiotic properties of lactic acid bacteria and their interference with human intestinal pathogens invasion.
Gut Pathogens. 9, 1-12.

CASTIAUX, V., LALOUX, L., SCHNEIDER, Y. J. & MAHILLON, J. (2016):

Screening of Cytotoxic *B. cereus* on Differentiated Caco-2 Cells and in Co-Culture with Mucus-Secreting (HT29-MTX) Cells.
Toxins (Basel). 8, 1-21.

CAUBILLA-BARRON, J., HURRELL, E., TOWNSEND, S., CHEETHAM, P., LOC-CARRILLO, C., FAYET, O., PRERE, M. F. & FORSYTHE, S. J. (2007):

Genotypic and phenotypic analysis of *Enterobacter sakazakii* strains from an outbreak resulting in fatalities in a neonatal intensive care unit in France.

Journal of Clinical Microbiology. 45, 3979-3985.

CHAP, J., JACKSON, P., SIQUEIRA, R., GASPAR, N., QUINTAS, C., PARK, J., OSAILI, T., SHAKER, R., JARADAT, Z., HARTANTYO, S. H., ABDULLAH SANI, N., ESTUNINGSIH, S. & FORSYTHE, S. J. (2009):

International survey of *Cronobacter sakazakii* and other *Cronobacter* spp. in follow up formulas and infant foods.

International Journal of Food Microbiology. 136, 185-188.

CLAUD, E. C. (2009):

Neonatal Necrotizing Enterocolitis -Inflammation and Intestinal Immaturity.

Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents in Medicinal Chemistry. 8, 248-259.

CLAUD, E. C. & WALKER, W. A. (2001):

Hypothesis: inappropriate colonization of the premature intestine can cause neonatal necrotizing enterocolitis.

FASEB Journal. 15, 1398-1403.

CLAVEL, T., CARLIN, F., LAIRON, D., NGUYEN-THE, C. & SCHMITT, P. (2004):

Survival of *Bacillus cereus* spores and vegetative cells in acid media simulating human stomach.

Journal of Applied Microbiology. 97, 214-219.

COLLADO, M. C., MERILUOTO, J. & SALMINEN, S. (2007):

Measurement of aggregation properties between probiotics and pathogens: *In vitro* evaluation of different methods.

Journal of Microbiological Methods. 71, 71-74.

COLWELL, R. R., BRAYTON, P., HERRINGTON, D., TALL, B., HUQ, A. & LEVINE, M. M. (1996):

Viable but non-culturable *Vibrio cholerae* O1 revert to a cultivable state in the human intestine.

World Journal of Microbiology & Biotechnology. 12, 28-31.

CORR, S. C., GAHAN, C. G. & HILL, C. (2007):

Impact of selected *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species on *Listeria monocytogenes* infection and the mucosal immune response.

FEMS Immunology and Medical Microbiology. 50, 380-388.

CORTI, G., PANUNZI, I., LOSCO, M. & BUZZI, R. (2007):

Postsurgical osteomyelitis caused by *Enterobacter sakazakii* in a healthy young man.

Journal of Chemotherapy. 19, 94-96.

COSTERTON, J. W., CHENG, K. J., GEESEY, G. G., LADD, T. I., NICKEL, J. C., DASGUPTA, M. & MARRIE, T. J. (1987):

Bacterial biofilms in nature and disease.

Annual Review of Microbiology. 41, 435-464.

COSTERTON, J. W., LEWANDOWSKI, Z., CALDWELL, D. E., KORBER, D. R. & LAPPIN-SCOTT, H. M. (1995):

Microbial biofilms.

Annual Review of Microbiology. 49, 711-745.

CRIELLY, E. M., LOGAN, N. A. & ANDERTON, A. (1994):

Studies on the *Bacillus* flora of milk and milk products.

Journal of Applied Microbiology. 77, 256-263.

DANCER, G. I., MAH, J. H., RHEE, M. S., HWANG, I. G. & KANG, D. H. (2009):

Resistance of *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) to environmental stresses.

Journal of Applied Microbiology. 107, 1606-1614.

DANESE, P. N., PRATT, L. A. & KOLTER, R. (2000):

Exopolysaccharide production is required for development of *Escherichia coli* K-12 biofilm architecture.

Journal of Bacteriology. 182, 3593-3596.

DESIN, T. S., LAM, P. K., KOCH, B., MICKAEL, C., BERBEROV, E., WISNER, A. L., TOWNSEND, H. G., POTTER, A. A. & KOSTER, W. (2009):

Salmonella enterica serovar enteritidis pathogenicity island 1 is not essential for but facilitates rapid systemic spread in chickens.

Infection and Immunity. 77, 2866-2875.

DGKJ, ÖGKJ & SGP (2009):

Empfehlungen zu Prä- und Probiotika in Säuglingsanfangsnahrungen.

Ernährungskommission der Deutschen Gesellschaft für Kinder- und Jugendmedizin (DGKJ), Ernährungskommission der Österreichischen Gesellschaft für Kinder und Jugendheilkunde (ÖGKJ) und Ernährungskommission der Schweizerischen Gesellschaft für Pädiatrie (SGP).

Monatsschrift Kinderheilkunde. 157, 267-270.

DI GIACINTO, C., MARINARO, M., SANCHEZ, M., STROBER, W. & BOIRIVANT, M. (2005):

Probiotics ameliorate recurrent Th1-mediated murine colitis by inducing IL-10 and IL-10-dependent TGF-beta-bearing regulatory cells.

Journal of Immunology. 174, 3237-3246.

DIDIER, A., DIETRICH, R., GRUBER, S., BOCK, S., MORAVEK, M., NAKAMURA, T., LINDBACK, T., GRANUM, P. E. & MARTLBAUER, E. (2012):

Monoclonal antibodies neutralize *Bacillus cereus* Nhe enterotoxin by inhibiting ordered binding of its three exoprotein components.

Infection and Immunity. 80, 832-838.

DRUDY, D., MULLANE, N. R., QUINN, T., WALL, P. G. & FANNING, S. (2006):

Enterobacter sakazakii: an emerging pathogen in powdered infant formula.

Clinical Infectious Diseases. 42, 996-1002.

EDELSON-MAMMEL, S., PORTEOUS, M. K. & BUCHANAN, R. L. (2006):

Acid resistance of twelve strains of *Enterobacter sakazakii*, and the impact of habituating cells to

an acidic environment.

Journal of Food Science. 71, 201-207.

EISENREICH, W., DANDEKAR, T., HEESEMANN, J. & GOEBEL, W. (2010):

Carbon metabolism of intracellular bacterial pathogens and possible links to virulence.

Nature Reviews: Microbiology. 8, 401-412.

EL-SHAROUD, W. M., O'BRIEN, S., NEGREDO, C., IVERSEN, C., FANNING, S. & HEALY, B. (2009):

Characterization of *Cronobacter* recovered from dried milk and related products.

BMC Microbiology. 9, 24.

EMAMI, C. N., MITTAL, R., WANG, L., FORD, H. R. & PRASADARAO, N. V. (2011):

Recruitment of dendritic cells is responsible for intestinal epithelial damage in the pathogenesis of necrotizing enterocolitis by *Cronobacter sakazakii*.

Journal of Immunology. 186, 7067-7079.

FAKRUDDIN, M., NIZANUR RAHAMAN, M., NUR HOSSAIN, M. & MONZUR MORSHED, A. (2017):

Induction and Resuscitation of *Cronobacter sakazakii* into Viable but Non-culturable State at Low Temperature in Water Microcosm.

Asian Journal of Biological Science. 10, 64-71.

FAO/WHO (2004):

Enterobacter sakazakii and other microorganisms in powdered infant formula: meeting report.

Microbial risk assesment series No. 6.

ISBN 9241562625.

FAO/WHO (2006):

Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria.

In: Probiotics in food: Health and nutritional properties and guidelines for evaluation. FAO Food And Nutrition Paper. 85. Rome, ISBN 9251055130.

FAO/WHO (2007):

Safe preparation, storage and handling of powdered infant formula: Guidelines.

World Health Organisation, Geneva, Switzerland.

FARMER, J. J., ASBURY, M., HICKMAN, F., BRENNER, D. J. & GROUP, E. S. (1980):

Enterobacter sakazakii: a new species of "*Enterobacteriaceae*" isolated from clinical specimens.

International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 30, 569-584.

FEENEY, A. & SLEATOR, R. D. (2011):

An in silico analysis of osmotolerance in the emerging gastrointestinal pathogen *Cronobacter sakazakii*.

Bioeng Bugs. 2, 260-270.

- FEI, P., JIANG, Y., FENG, J., FORSYTHE, S. J., LI, R., ZHOU, Y. & MAN, C. (2017):
Antibiotic and Desiccation Resistance of *Cronobacter sakazakii* and *C. malonaticus* Isolates from Powdered Infant Formula and Processing Environments.
Frontiers in Microbiology. 8, 316.
- FERNANDEZ RAMIREZ, M. D., SMID, E. J., ABEE, T. & NIEROP GROOT, M. N. (2015):
Characterisation of biofilms formed by *Lactobacillus plantarum* WCFS1 and food spoilage isolates.
International Journal of Food Microbiology. 207, 23-29.
- FISHER, M. L., ALLEN, R., LUO, Y. & CURTISS, R. (2013):
Export of extracellular polysaccharides modulates adherence of the *Cyanobacterium synechocystis*.
PLoS One. 8, 1-10.
- FLEMMING, H. C. & WINGENDER, J. (2010):
The biofilm matrix.
Nature Reviews: Microbiology. 8, 623-633.
- FLYNN, S., VAN SINDEREN, D., THORNTON, G. M., HOLO, H., NES, I. F. & COLLINS, J. K. (2002):
Characterization of the genetic locus responsible for the production of ABP-118, a novel bacteriocin produced by the probiotic bacterium *Lactobacillus salivarius* subsp. *salivarius* UCC118.
Microbiology. 148, 973-984.
- FRANCO, A. A., HU, L., GRIM, C. J., GOPINATH, G., SATHYAMOORTHY, V., JARVIS, K. G., LEE, C., SADOWSKI, J., KIM, J., KOTHARY, M. H., MCCARDELL, B. A. & TALL, B. D. (2011):
Characterization of putative virulence genes on the related RepFIB plasmids harbored by *Cronobacter* spp.
Applied and Environmental Microbiology. 77, 3255-3267.
- FRIEDEMANN, M. (2009):
Epidemiology of invasive neonatal *Cronobacter* (*Enterobacter sakazakii*) infections.
European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases. 28, 1297-1304.
- FUKUSHIMA, Y., KAWATA, Y., HARA, H., TERADA, A. & MITSUOKA, T. (1998):
Effect of a probiotic formula on intestinal immunoglobulin A production in healthy children.
International Journal of Food Microbiology. 42, 39-44.
- GAGNON, M., ZIHLER BERNER, A., CHERVET, N., CHASSARD, C. & LACROIX, C. (2013):
Comparison of the Caco-2, HT-29 and the mucus-secreting HT29-MTX intestinal cell models to investigate *Salmonella* adhesion and invasion.
Journal of Microbiological Methods. 94, 274-279.
- GILL, N., WLODARSKA, M. & FINLAY, B. B. (2011):
Roadblocks in the gut: barriers to enteric infection.

Cellular Microbiology. 13, 660-669.

GOSNEY, M. (2008):

Enterobacter sakazakii bacteraemia with multiple splenic abscesses in a 75-year-old woman: a case report.

Age and Ageing. 37, 236-237.

GOSNEY, M. A., MARTIN, M. V., WRIGHT, A. E. & GALLAGHER, M. (2006):

Enterobacter sakazakii in the mouths of stroke patients and its association with aspiration pneumonia.

European Journal of Internal Medicine. 17, 185-188.

GRIMM, M., STEPHAN, R., IVERSEN, C., MANZARDO, G. G., RATTEI, T., RIEDEL, K., RUEPP, A., FRISHMAN, D. & LEHNER, A. (2008):

Cellulose as an extracellular matrix component present in *Enterobacter sakazakii* biofilms.

Journal of Food Protection. 71, 13-18.

GURTLE, J. B., KORNACKI, J. L. & BEUCHAT, L. R. (2005):

Enterobacter sakazakii: a coliform of increased concern to infant health.

International Journal of Food Microbiology. 104, 1-34.

HARTMANN, I., CARRANZA, P., LEHNER, A., STEPHAN, R., EBERL, L. & RIEDEL, K. (2010):

Genes involved in *Cronobacter sakazakii* biofilm formation.

Applied and Environmental Microbiology. 76, 2251-2261.

HEALY, B., COONEY, S., O'BRIEN, S., IVERSEN, C., WHYTE, P., NALLY, J., CALLANAN, J. J. & FANNING, S. (2010):

Cronobacter (*Enterobacter sakazakii*): an opportunistic foodborne pathogen.

Foodborne Pathogens and Disease. 7, 339-350.

HEUVELINK, A. E., AHMED, M., KODDE, F. D., ZWARTKRUIS-NAHUIS, J. T. M. & DE BOER, E. (2002):

Enterobacter sakazakii in Melkpoeder.

de Ware(n) Chemicus. 32, 17-30.

HIMELRIGHT, I., HARRIS, E., LORCH, V. & ANDERSON, M. (2002):

Enterobacter sakazakii infections associated with the use of powdered infant formula-Tennessee, 2001.

Morbidity and Mortality Weekly Report. 51, 297-300.

HOLY, O. & FORSYTHE, S. (2013):

Cronobacter spp. as emerging causes of healthcare-associated infection.

Journal of Hospital Infection. 86, 169-177.

HU, L., GRIM, C. J., FRANCO, A. A., JARVIS, K. G., SATHYAMOORTHY, V., KOTHARY, M. H., MCCARDELL, B. A. & TALL, B. D. (2015):

Analysis of the cellulose synthase operon genes, *bcsA*, *bcsB*, and *bcsC* in *Cronobacter* species: Prevalence among species and their roles in biofilm formation and cell-cell aggregation.

Food Microbiology. 52, 97-105.

HUET, C., SAHUQUILLO-MERINO, C., COUDRIER, E. & LOUVARD, D. (1987):

Absorptive and mucus-secreting subclones isolated from a multipotent intestinal cell line (HT-29) provide new models for cell polarity and terminal differentiation.

Journal of Cell Biology. 105, 345-357.

HUNTER, C. J., SINGAMSETTY, V. K., CHOKSHI, N. K., BOYLE, P., CAMERINI, V., GRISHIN, A. V., UPPERMAN, J. S., FORD, H. R. & PRASADARAO, N. V. (2008):

Enterobacter sakazakii enhances epithelial cell injury by inducing apoptosis in a rat model of necrotizing enterocolitis.

Journal of Infectious Diseases. 198, 586-593.

HURRELL, E., KUCEROVA, E., LOUGHLIN, M., CAUBILLA-BARRON, J. & FORSYTHE, S. J. (2009):

Biofilm formation on enteral feeding tubes by *Cronobacter sakazakii*, *Salmonella* serovars and other *Enterobacteriaceae*.

International Journal of Food Microbiology. 136, 227-231.

IRETON, K. & COSSART, P. (1997):

Host-pathogen interactions during entry and actin-based movement of *Listeria monocytogenes*.

Annual Review of Genetics. 31, 113-138.

ISLAM, S. T. & LAM, J. S. (2014):

Synthesis of bacterial polysaccharides via the Wzx/Wzy-dependent pathway.

Canadian Journal of Microbiology. 60, 697-716.

ISO 22964:2017 Mikrobiologie der Lebensmittelkette - Horizontales Verfahren zum Nachweis von *Cronobacter* spp.

IVERSEN, C. & FORSYTHE, S. (2004a):

Isolation of *Enterobacter sakazakii* and other *Enterobacteriaceae* from powdered infant formula milk and related products.

Food Microbiology. 21, 771-777.

IVERSEN, C., LANE, M. & FORSYTHE, S. J. (2004b):

The growth profile, thermotolerance and biofilm formation of *Enterobacter sakazakii* grown in infant formula milk.

Letters in Applied Microbiology. 38, 378-382.

IVERSEN, C., LEHNER, A., MULLANE, N., BIDLAS, E., CLEENWERCK, I., MARUGG, J., FANNING, S., STEPHAN, R. & JOOSTEN, H. (2007):

The taxonomy of *Enterobacter sakazakii*: proposal of a new genus *Cronobacter* gen. nov. and descriptions of *Cronobacter sakazakii* comb. nov. *Cronobacter sakazakii* subsp. *sakazakii*, comb. nov., *Cronobacter sakazakii* subsp. *malonaticus* subsp. nov., *Cronobacter turicensis* sp. nov., *Cronobacter muytjensii* sp. nov., *Cronobacter dublinensis* sp. nov. and *Cronobacter genomospecies* 1.

BMC Evolutionary Biology. 7, 64.

IVERSEN, C., MULLANE, N., MCCARDELL, B., TALL, B. D., LEHNER, A., FANNING, S., STEPHAN, R. & JOOSTEN, H. (2008):

Cronobacter gen. nov., a new genus to accommodate the biogroups of *Enterobacter sakazakii*, and proposal of *Cronobacter sakazakii* gen. nov., comb. nov., *Cronobacter malonaticus* sp. nov., *Cronobacter turicensis* sp. nov., *Cronobacter muytjensii* sp. nov., *Cronobacter dublinensis* sp. nov., *Cronobacter* genomospecies 1, and of three subspecies, *Cronobacter dublinensis* subsp. *dublinensis* subsp. nov., *Cronobacter dublinensis* subsp. *lausannensis* subsp. nov. and *Cronobacter dublinensis* subsp. *lactaridi* subsp. nov.

International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 58, 1442-1447.

JACOBSEN, C. N., ROSENFELDT NIELSEN, V., HAYFORD, A. E., MOLLER, P. L., MICHAELSEN, K. F., PAERREGAARD, A., SANDSTROM, B., TVEDE, M. & JAKOBSEN, M. (1999):

Screening of probiotic activities of forty-seven strains of *Lactobacillus* spp. by in vitro techniques and evaluation of the colonization ability of five selected strains in humans.

Applied and Environmental Microbiology. 65, 4949-4956.

JARADAT, Z. W., ABABNEH, Q. O., SAADOUN, I. M., SAMARA, N. A. & RASHDAN, A. M. (2009):

Isolation of *Cronobacter* spp. (formerly *Enterobacter sakazakii*) from infant food, herbs and environmental samples and the subsequent identification and confirmation of the isolates using biochemical, chromogenic assays, PCR and 16S rRNA sequencing.

BMC Microbiology. 9, 225.

JARADAT, Z. W., AL MOUSA, W., ELBETIEHA, A., AL NABULSI, A. & TALL, B. D. (2014):

Cronobacter spp.--opportunistic food-borne pathogens. A review of their virulence and environmental-adaptive traits.

Journal of Medical Microbiology. 63, 1023-1037.

JARVIS, K. G., GRIM, C. J., FRANCO, A. A., GOPINATH, G., SATHYAMOORTHY, V., HU, L., SADOWSKI, J. A., LEE, C. S. & TALL, B. D. (2011):

Molecular Characterization of *Cronobacter* Lipopolysaccharide O-Antigen Gene Clusters and Development of Serotype-Specific PCR Assays.

Applied and Environmental Microbiology. 77, 4017-4026.

JESSBERGER, N., DIETRICH, R., BOCK, S., DIDIER, A. & MARTLBAUER, E. (2014):

Bacillus cereus enterotoxins act as major virulence factors and exhibit distinct cytotoxicity to different human cell lines.

Toxicon. 77, 49-57.

JOHLER, S., STEPHAN, R., HARTMANN, I., KUEHNER, K. A. & LEHNER, A. (2010):

Genes involved in yellow pigmentation of *Cronobacter sakazakii* ES5 and influence of pigmentation on persistence and growth under environmental stress.

Applied and Environmental Microbiology. 76, 1053-1061.

JONES, B. D. & FALKOW, S. (1994):

Identification and characterization of a *Salmonella typhimurium* oxygen-regulated gene required

for bacterial internalization.

Infection and Immunity. 62, 3745-3752.

JOSEPH, S., CETINKAYA, E., DRAHOVSKA, H., LEVICAN, A., FIGUERAS, M. J. & FORSYTHE, S. J. (2012):

Cronobacter condimenti sp. nov., isolated from spiced meat, and *Cronobacter universalis* sp. nov., a species designation for *Cronobacter* sp. *genomospecies* 1, recovered from a leg infection, water and food ingredients.

International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 62, 1277-1283.

JUNG, J. H., CHOI, N. Y. & LEE, S. Y. (2013):

Biofilm formation and exopolysaccharide (EPS) production by *Cronobacter sakazakii* depending on environmental conditions.

Food Microbiology. 34, 70-80.

KENT, R. M., FITZGERALD, G. F., HILL, C., STANTON, C. & ROSS, R. P. (2015):

Novel approaches to improve the intrinsic microbiological safety of powdered infant milk formula.

Nutrients. 7, 1217-1244.

KILONZO-NTHENGE, A., ROTICH, E., GODWIN, S., NAHASHON, S. & CHEN, F. (2012):

Prevalence and antimicrobial resistance of *Cronobacter sakazakii* isolated from domestic kitchens in middle Tennessee, United States.

Journal of Food Protection. 75, 1512-1517.

KIM, H., RYU, J. H. & BEUCHAT, L. R. (2006):

Attachment of and biofilm formation by *Enterobacter sakazakii* on stainless steel and enteral feeding tubes.

Applied and Environmental Microbiology. 72, 5846-5856.

KIM, K., KIM, K. P., CHOI, J., LIM, J. A., LEE, J., HWANG, S. & RYU, S. (2010):

Outer membrane proteins A (OmpA) and X (OmpX) are essential for basolateral invasion of *Cronobacter sakazakii*.

Applied and Environmental Microbiology. 76, 5188-5198.

KIM, K. P. & LOESSNER, M. J. (2008):

Enterobacter sakazakii invasion in human intestinal Caco-2 cells requires the host cell cytoskeleton and is enhanced by disruption of tight junction.

Infection and Immunity. 76, 562-570.

KONG, I. S., BATES, T. C., HULSMANN, A., HASSAN, H., SMITH, B. E. & OLIVER, J. D. (2004):

Role of catalase and *oxyR* in the viable but nonculturable state of *Vibrio vulnificus*.

FEMS Microbiology Ecology. 50, 133-142.

KÖNIG, J., BEYTHIEN, A. & BÖMER, A. (1914):

Untersuchung von Nahrungs-, Genussmitteln und Gebrauchsgegenständen.

4. Auflage. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

ISBN 9783662393208.

KRAGH, K. N., HUTCHISON, J. B., MELAUGH, G., RODESNEY, C., ROBERTS, A. E., IRIE, Y., JENSEN, P. O., DIGGLE, S. P., ALLEN, R. J., GORDON, V. & BJARNSHOLT, T. (2016):

Role of Multicellular Aggregates in Biofilm Formation.

MBio. 7, 1-16.

KUCEROVA, E., CLIFTON, S. W., XIA, X. Q., LONG, F., PORWOLLIK, S., FULTON, L., FRONICK, C., MINX, P., KYUNG, K., WARREN, W., FULTON, R., FENG, D., WOLLAM, A., SHAH, N., BHONAGIRI, V., NASH, W. E., HALLSWORTH-PEPIN, K., WILSON, R. K., MCCLELLAND, M. & FORSYTHE, S. J. (2010):

Genome sequence of *Cronobacter sakazakii* BAA-894 and comparative genomic hybridization analysis with other *Cronobacter* species.

PLoS One. 5, 1-10.

KUZINA, L. V., PELOQUIN, J. J., VACEK, D. C. & MILLER, T. A. (2001):

Isolation and identification of bacteria associated with adult laboratory Mexican fruit flies, *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae).

Current Microbiology. 42, 290-294.

LAI, K. K. (2001):

Enterobacter sakazakii infections among neonates, infants, children, and adults. Case reports and a review of the literature.

Medicine (Baltimore). 80, 113-122.

LEHNER, A., FRICKER-FEER, C. & STEPHAN, R. (2013):

Pathogene Mikroorganismen *Cronobacter* : Taxonomie, Eigenschaften und Präventionsmaßnahmen.

1. Auflage. B. Behr's Verlag GmbH & Co. KG. Hamburg

ISBN 9783954680405.

LEHNER, A., NITZSCHE, S., BREEUWER, P., DIEP, B., THELEN, K. & STEPHAN, R. (2006):

Comparison of two chromogenic media and evaluation of two molecular based identification systems for *Enterobacter sakazakii* detection.

BMC Microbiology. 6, 15.

LEHNER, A., RIEDEL, K., EBERL, L., BREEUWER, P., DIEP, B. & STEPHAN, R. (2005):

Biofilm formation, extracellular polysaccharide production, and cell-to-cell signaling in various *Enterobacter sakazakii* strains: aspects promoting environmental persistence.

Journal of Food Protection. 68, 2287-2294.

LEIMEISTER-WACHTER, M., DOMANN, E. & CHAKRABORTY, T. (1992):

The expression of virulence genes in *Listeria monocytogenes* is thermoregulated.

Journal of Bacteriology. 174, 947-952.

LENZ, A. P., WILLIAMSON, K. S., PITTS, B., STEWART, P. S. & FRANKLIN, M. J. (2008):

Localized gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms.

Applied and Environmental Microbiology. 74, 4463-4471.

LI, L., MENDIS, N., TRIGUI, H., OLIVER, J. D. & FAUCHER, S. P. (2014):

The importance of the viable but non-culturable state in human bacterial pathogens.

Frontiers in Microbiology. 5, 1-20.

LINDBACK, T., HARDY, S. P., DIETRICH, R., SODRING, M., DIDIER, A., MORAVEK, M., FAGERLUND, A., BOCK, S., NIELSEN, C., CASTEEL, M., GRANUM, P. E. & MARTLBAUER, E. (2010):

Cytotoxicity of the *Bacillus cereus* Nhe enterotoxin requires specific binding order of its three exoprotein components.

Infection and Immunity. 78, 3813-3821.

LLEO, M. M., PIEROBON, S., TAFI, M. C., SIGNORETTO, C. & CANEPARI, P. (2000):

mRNA detection by reverse transcription-PCR for monitoring viability over time in an *Enterococcus faecalis* viable but nonculturable population maintained in a laboratory microcosm.

Applied and Environmental Microbiology. 66, 4564-4567.

LUND, T. & GRANUM, P. E. (1996):

Characterisation of a non-haemolytic enterotoxin complex from *Bacillus cereus* isolated after a foodborne outbreak.

FEMS Microbiology Letters. 141, 151-156.

MANGE, J. P., STEPHAN, R., BOREL, N., WILD, P., KIM, K. S., POSPISCHIL, A. & LEHNER, A. (2006):

Adhesive properties of *Enterobacter sakazakii* to human epithelial and brain microvascular endothelial cells.

BMC Microbiology. 6, 58.

MATTHYSSE, A. G., HOLMES, K. V. & GURLITZ, R. H. (1981):

Elaboration of cellulose fibrils by *Agrobacterium tumefaciens* during attachment to carrot cells.

Journal of Bacteriology. 145, 583-595.

MCGUCKIN, M. A., LINDEN, S. K., SUTTON, P. & FLORIN, T. H. (2011):

Mucin dynamics and enteric pathogens.

Nature Reviews: Microbiology. 9, 265-278.

MEIRELES, A., GONÇALVES, A. L., GOMES, I. B., SIMÕES, L. C. & SIMÕES, M. (2015):

Methods to study microbial adhesion on abiotic surfaces.

AIMS Bioengineering. 2, 297-309.

MIRANDA, C. D., KEHRENBURG, C., ULEP, C., SCHWARZ, S. & ROBERTS, M. C. (2003):

Diversity of tetracycline resistance genes in bacteria from Chilean salmon farms.

Antimicrobial Agents & Chemotherapy. 47, 883-888.

MISIRLILAR, F., KINIK, Ö. & YERLIKAYA, O. (2012):

Effect of protective culture and biopreservatives on strained yoghurt quality.

African Journal of Microbiology Research. 6 4696-4701.

MITTAL, R., BULGHERESI, S., EMAMI, C. & PRASADARAO, N. V. (2009a):

Enterobacter sakazakii targets DC-SIGN to induce immunosuppressive responses in dendritic cells by modulating MAPKs.

Journal of Immunology. 183, 6588-6599.

MITTAL, R., WANG, Y., HUNTER, C. J., GONZALEZ-GOMEZ, I. & PRASADARAO, N. V. (2009b):

Brain damage in newborn rat model of meningitis by *Enterobacter sakazakii*: a role for outer membrane protein A.

Laboratory Investigation. 89, 263-277.

MULLANE, N., O'GAORA, P., NALLY, J. E., IVERSEN, C., WHYTE, P., WALL, P. G. & FANNING, S. (2008):

Molecular analysis of the *Enterobacter sakazakii* O-antigen gene locus.

Applied and Environmental Microbiology. 74, 3783-3794.

MULLANE, N. R., IVERSEN, C., HEALY, B., WALSH, C., WHYTE, P., WALL, P. G., QUINN, T. & FANNING, S. (2007):

Enterobacter sakazakii an emerging bacterial pathogen with implications for infant health.

Minerva Pediatrica. 59, 137-148.

MUYTJENS, H. L. & KOLLE, L. A. (1990):

Enterobacter sakazakii meningitis in neonates: causative role of formula?

Pediatric Infectious Disease Journal. 9, 372-373.

MUYTJENS, H. L., ROELOFS-WILLEMSE, H. & JASPAR, G. H. (1988):

Quality of powdered substitutes for breast milk with regard to members of the family *Enterobacteriaceae*.

Journal of Clinical Microbiology. 26, 743-746.

NAIR, M. K. & VENKITANARAYANAN, K. (2007):

Role of bacterial OmpA and host cytoskeleton in the invasion of human intestinal epithelial cells by *Enterobacter sakazakii*.

Pediatric Research. 62, 664-669.

NAIR, M. K., VENKITANARAYANAN, K., SILBART, L. K. & KIM, K. S. (2009):

Outer membrane protein A (OmpA) of *Cronobacter sakazakii* binds fibronectin and contributes to invasion of human brain microvascular endothelial cells.

Foodborne Pathogens and Disease. 6, 495-501.

NAIR, M. K. & VENKITANARAYANAN, K. S. (2006):

Cloning and sequencing of the *ompA* gene of *Enterobacter sakazakii* and development of an *ompA*-targeted PCR for rapid detection of *Enterobacter sakazakii* in infant formula.

Applied and Environmental Microbiology. 72, 2539-2546.

NAZAROWEC-WHITE, M. & FARBER, J. M. (1997a):

Incidence, Survival, and Growth of *Enterobacter sakazakii* in Infant Formula.

Journal of Food Protection. 60, 226-230.

NAZAROWEC-WHITE, M. & FARBER, J. M. (1997b):

Thermal resistance of *Enterobacter sakazakii* in reconstituted dried-infant formula.

Letters in Applied Microbiology. 24, 9-13.

NICHOLSON, W. L., MUNAKATA, N., HORNECK, G., MELOSH, H. J. & SETLOW, P. (2000):

Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments.

Microbiology and Molecular Biology Reviews. 64, 548-572.

O'TOOLE, G., KAPLAN, H. B. & KOLTER, R. (2000):

Biofilm formation as microbial development.

Annual Review of Microbiology. 54, 49-79.

OGRODZKI, P. & FORSYTHE, S. (2015):

Capsular profiling of the *Cronobacter* genus and the association of specific *Cronobacter sakazakii* and *C. malonaticus* capsule types with neonatal meningitis and necrotizing enterocolitis.

BMC Genomics. 16, 1-15.

OLIVER, J. D. (2000):

The Public Health Significance of Viable but Nonculturable Bacteria.

In: *Nonculturable Microorganisms in the Environment*. Springer US. Washington D.C., 277-300

ISBN 9781475702712.

OLIVER, J. D. (2010):

Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria.

FEMS Microbiology Reviews. 34, 415-425.

OLIVER, J. D. & BOCKIAN, R. (1995):

In vivo resuscitation, and virulence towards mice, of viable but nonculturable cells of *Vibrio vulnificus*.

Applied and Environmental Microbiology. 61, 2620-2623.

PAGOTTO, F. J., NAZAROWEC-WHITE, M., BIDAVID, S. & FARBER, J. M. (2003):

Enterobacter sakazakii: infectivity and enterotoxin production in vitro and in vivo.

Journal of Food Protection. 66, 370-375.

PAN, Z., CUI, J., LYU, G., DU, X., QIN, L., GUO, Y., XU, B., LI, W., CUI, Z. & ZHAO, C. (2014):

Isolation and molecular typing of *Cronobacter* spp. in commercial powdered infant formula and follow-up formula.

Foodborne Pathogens and Disease. 11, 456-461.

PANKOV, R. & YAMADA, K. M. (2002):

Fibronectin at a glance.

Journal of Cell Science. 115, 3861-3863.

PATRICK, M. E., MAHON, B. E., GREENE, S. A., ROUNDS, J., CRONQUIST, A., WYMORE, K., BOOTHE, E., LATHROP, S., PALMER, A. & BOWEN, A. (2014):

Incidence of *Cronobacter* spp. infections, United States, 2003-2009.

Emerging Infectious Diseases. 20, 1520-1523.

PENTECOST, M., OTTO, G., THERIOT, J. A. & AMIEVA, M. R. (2006):

Listeria monocytogenes invades the epithelial junctions at sites of cell extrusion.

PLoS Pathogens. 2, 29-40.

PINTO, D., ALMEIDA, V., ALMEIDA SANTOS, M. & CHAMBEL, L. (2011):

Resuscitation of *Escherichia coli* VBNC cells depends on a variety of environmental or chemical stimuli.

Journal of Applied Microbiology. 110, 1601-1611.

PIZARRO-CERDA, J., KUHBAACHER, A. & COSSART, P. (2012):

Entry of *Listeria monocytogenes* in mammalian epithelial cells: an updated view.

Cold Spring Harbor Perspective in Medicine. 2, 1-17.

PUREVDORJ-GAGE, B., COSTERTON, W. J. & STOODLEY, P. (2005):

Phenotypic differentiation and seeding dispersal in non-mucoid and mucoid *Pseudomonas aeruginosa* biofilms.

Microbiology. 151, 1569-1576.

QIN, H. L., SHEN, T. Y., GAO, Z. G., FAN, X. B., HANG, X. M., JIANG, Y. Q. & ZHANG, H. Z. (2005):

Effect of *Lactobacillus* on the gut microflora and barrier function of the rats with abdominal infection.

World Journal of Gastroenterology. 11, 2591-2596.

RAGHAV, M. & AGGARWAL, P. K. (2007):

Purification and characterization of *Enterobacter sakazakii* enterotoxin.

Canadian Journal of Microbiology. 53, 750-755.

RAHMAN, I., SHAHAMAT, M., KIRCHMAN, P. A., RUSSEK-COHEN, E. & COLWELL, R. R. (1994):

Methionine uptake and cytopathogenicity of viable but nonculturable *Shigella dysenteriae* type 1.

Applied and Environmental Microbiology. 60, 3573-3578.

REID, G., MCGROARTY, J. A., ANGOTTI, R. & COOK, R. L. (1988):

Lactobacillus inhibitor production against *Escherichia coli* and coaggregation ability with uropathogens.

Canadian Journal of Microbiology. 34, 344-351.

REYES, J. E., BASTIAS, J. M., GUTIERREZ, M. R. & RODRIGUEZ MDE, L. (2007):

Prevalence of *Bacillus cereus* in dried milk products used by Chilean School Feeding Program.

Food Microbiology. 24, 1-6.

RIEDEL, K. & LEHNER, A. (2007):

Identification of proteins involved in osmotic stress response in *Enterobacter sakazakii* by proteomics.

Proteomics. 7, 1217-1231.

ROMLING, U., SIERRALTA, W. D., ERIKSSON, K. & NORMARK, S. (1998):

Multicellular and aggregative behaviour of *Salmonella typhimurium* strains is controlled by mutations in the *agfD* promoter.

Molecular Microbiology. 28, 249-264.

RONIMUS, R. S., RUECKERT, A. & MORGAN, H. W. (2006):

Survival of thermophilic spore-forming bacteria in a 90+ year old milk powder from Ernest Shackelton's Cape Royds Hut in Antarctica.

Journal of Dairy Research. 73, 235-243.

ROSS, P., MAYER, R. & BENZIMAN, M. (1991):

Cellulose biosynthesis and function in bacteria.

Microbiological Reviews. 55, 35-58.

ROUQUETTE, C. & BERCHE, P. (1996):

The pathogenesis of infection by *Listeria monocytogenes*.

Microbiologia. 12, 245-258.

ROUWET, E. V., HEINEMAN, E., BUURMAN, W. A., TER RIET, G., RAMSAY, G. & BLANCO, C. E. (2002):

Intestinal permeability and carrier-mediated monosaccharide absorption in preterm neonates during the early postnatal period.

Pediatric Research. 51, 64-70.

RUECKERT, A., RONIMUS, R. S. & MORGAN, H. W. (2005):

Development of a rapid detection and enumeration method for thermophilic *bacilli* in milk powders.

Journal of Microbiological Methods. 60, 155-167.

SALMINEN, S., OUWEHAND, A., BENNO, Y. & LEE, Y. K. (1999):

Probiotics: how should they be defined?

Trends in Food Science & Technology. 10, 107-110.

SAMUEL, G. & REEVES, P. (2003):

Biosynthesis of O-antigens: genes and pathways involved in nucleotide sugar precursor synthesis and O-antigen assembly.

Carbohydrate Research. 338, 2503-2519.

SARTOR, R. B. (2005):

Probiotic therapy of intestinal inflammation and infections.

Current Opinion of Gastroenterology. 21, 44-50.

SCHARINGER, E. J., DIETRICH, R., KLEINSTEUBER, I., MARTLBAUER, E. & SCHAUER, K. (2016):

Simultaneous Rapid Detection and Serotyping of *Cronobacter sakazakii* Serotypes O1, O2, and O3 by Using Specific Monoclonal Antibodies.

Applied and Environmental Microbiology. 82, 2300-2311.

SCHEEPE-LEBERKÜHNE, M. & WAGNER, F. (1986):

Optimization and preliminary characterization of an exopolysaccharide synthesized by *Enterobacter sakazakii*.

Biotechnology Letters. 8, 695-700.

SCHELLENBERG, J., SMORAGIEWICZ, W. & KARSKA-WYSOCKI, B. (2006):

A rapid method combining immunofluorescence and flow cytometry for improved understanding of competitive interactions between lactic acid bacteria (LAB) and methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) in mixed culture.

Journal of Microbiological Methods. 65, 1-9.

SCHLAMOWITZ, M. & PETERSON, L. U. (1959):

Studies on the optimum pH for the action of pepsin on "native" and denatured bovine serum albumin and bovine hemoglobin.

Journal of Biological Chemistry. 234, 3137-3145.

SCHMID, M., IVERSEN, C., GONTIA, I., STEPHAN, R., HOFMANN, A., HARTMANN, A., JHA, B., EBERL, L., RIEDEL, K. & LEHNER, A. (2009):

Evidence for a plant-associated natural habitat for *Cronobacter* spp.

Research in Microbiology. 160, 608-814.

SCHWIZER, S., TASARA, T., ZURFLUH, K., STEPHAN, R. & LEHNER, A. (2013):

Identification of genes involved in serum tolerance in the clinical strain *Cronobacter sakazakii* ES5.

BMC Microbiology. 13, 38.

SENGUPTA, R., ALTERMANN, E., ANDERSON, R. C., MCNABB, W. C., MOUGHAN, P. J. & ROY, N. C. (2013):

The role of cell surface architecture of *Lactobacilli* in host-microbe interactions in the gastrointestinal tract.

Mediators of Inflammation. 2013, 1-16.

SENOH, M., GHOSH-BANERJEE, J., RAMAMURTHY, T., COLWELL, R. R., MIYOSHI, S., NAIR, G. B. & TAKEDA, Y. (2012):

Conversion of viable but nonculturable enteric bacteria to culturable by co-culture with eukaryotic cells.

Microbiology and Immunology. 56, 502-507.

SENOH, M., HAMABATA, T. & TAKEDA, Y. (2015):

A factor converting viable but nonculturable *Vibrio cholerae* to a culturable state in eukaryotic

cells is a human catalase.

Microbiologyopen. 4, 589-596.

SHEN, T. Y., QIN, H. L., GAO, Z. G., FAN, X. B., HANG, X. M. & JIANG, Y. Q. (2006):

Influences of enteral nutrition combined with probiotics on gut microflora and barrier function of rats with abdominal infection.

World Journal of Gastroenterology. 12, 4352-4358.

SILANO, M., PAGANIN, P. & DAVANZO, R. (2016):

Time for the 70 degrees C water precautionary option in the home dilution of powdered infant formula.

Italian Journal of Pediatrics. 42, 1-3.

SIMMONS, B. P., GELFAND, M. S., HAAS, M., METTS, L. & FERGUSON, J. (1989):

Enterobacter sakazakii infections in neonates associated with intrinsic contamination of a powdered infant formula.

Infection Control and Hospital Epidemiology. 10, 398-401.

SINGAMSETTY, V. K., WANG, Y., SHIMADA, H. & PRASADARAO, N. V. (2008):

Outer membrane protein A expression in *Enterobacter sakazakii* is required to induce microtubule condensation in human brain microvascular endothelial cells for invasion.

Microbial Pathogenesis. 45, 181-191.

SMITH, S. G., MAHON, V., LAMBERT, M. A. & FAGAN, R. P. (2007):

A molecular Swiss army knife: OmpA structure, function and expression.

FEMS Microbiology Letters. 273, 1-11.

SOLANO, C., ECHEVERZ, M. & LASA, I. (2014):

Biofilm dispersion and quorum sensing.

Current Opinion in Microbiology. 18, 96-104.

SOLANO, C., GARCIA, B., VALLE, J., BERASAIN, C., GHIGO, J. M., GAMAZO, C. & LASA, I. (2002):

Genetic analysis of *Salmonella enteritidis* biofilm formation: critical role of cellulose.

Molecular Microbiology. 43, 793-808.

SONDHEIMER, J. M., CLARK, D. A. & GERVAISE, E. P. (1985):

Continuous gastric pH measurement in young and older healthy preterm infants receiving formula and clear liquid feedings.

Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition. 4, 352-355.

STENFORS ARNESEN, L. P., FAGERLUND, A. & GRANUM, P. E. (2008):

From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins.

FEMS Microbiology Reviews. 32, 579-606.

STEPHAN, R., GRIM, C. J., GOPINATH, G. R., MAMMEL, M. K., SATHYAMOORTHY, V., TRACH, L. H., CHASE, H. R., FANNING, S. & TALL, B. D. (2014):

Re-examination of the taxonomic status of *Enterobacter helveticus*, *Enterobacter pulveris* and *Enterobacter turicensis* as members of the genus *Cronobacter* and their reclassification in the genera *Franconibacter* gen. nov. and *Siccibacter* gen. nov. as *Franconibacter helveticus* comb. nov., *Franconibacter pulveris* comb. nov. and *Siccibacter turicensis* comb. nov., respectively.

International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 64, 3402-3410.

STEPHAN, R., LEHNER, A., TISCHLER, P. & RATTEI, T. (2011):

Complete genome sequence of *Cronobacter turicensis* LMG 23827, a food-borne pathogen causing deaths in neonates.

Journal of Bacteriology. 193, 309-310.

STEWART, P. S. & FRANKLIN, M. J. (2008):

Physiological heterogeneity in biofilms.

Nature Reviews: Microbiology. 6, 199-210.

STOODLEY, P., HALL-STOODLEY, L. & LAPPIN-SCOTT, H. M. (2001):

Detachment, surface migration, and other dynamic behavior in bacterial biofilms revealed by digital time-lapse imaging.

Methods in Enzymology. 337, 306-319.

SUN, Y., WANG, M., LIU, H., WANG, J., HE, X., ZENG, J., GUO, X., LI, K., CAO, B. & WANG, L. (2011):

Development of an O-antigen serotyping scheme for *Cronobacter sakazakii*.

Applied and Environmental Microbiology. 77, 2209-2214.

SUN, Y., WANG, M., WANG, Q., CAO, B., HE, X., LI, K., FENG, L. & WANG, L. (2012):

Genetic analysis of the *Cronobacter sakazakii* O4 to O7 O-antigen gene clusters and development of a PCR assay for identification of all *C. sakazakii* O serotypes.

Applied and Environmental Microbiology. 78, 3966-3974.

SUPPIGER, A., ESHWAR, A. K., STEPHAN, R., KAEVER, V., EBERL, L. & LEHNER, A. (2016):

The DSF type quorum sensing signalling system RpfF/R regulates diverse phenotypes in the opportunistic pathogen *Cronobacter*.

Sci Rep. 6, 18753.

TOWNSEND, S., HURRELL, E. & FORSYTHE, S. (2008):

Virulence studies of *Enterobacter sakazakii* isolates associated with a neonatal intensive care unit outbreak.

BMC Microbiology. 8, 64.

TOWNSEND, S. M., HURRELL, E., GONZALEZ-GOMEZ, I., LOWE, J., FRYE, J. G., FORSYTHE, S. & BADGER, J. L. (2007):

Enterobacter sakazakii invades brain capillary endothelial cells, persists in human macrophages influencing cytokine secretion and induces severe brain pathology in the neonatal rat.

Microbiology. 153, 3538-3547.

VO(EG)2073/2005 (2005):

Verordnung (EG) Nr. 2073/2005 der Kommission vom 15. November 2005 über mikrobiologische Kriterien für Lebensmittel.

338 (22.12.2005), 1-37.

WALSH, D., MOLLOY, C., IVERSEN, C., CARROLL, J., CAGNEY, C., FANNING, S. & DUFFY, G. (2011):

Survival characteristics of environmental and clinically derived strains of *Cronobacter sakazakii* in infant milk formula (IMF) and ingredients.

Journal of Applied Microbiology. 110, 697-703.

WANG, L., WANG, Q. & REEVES, P. R. (2010):

The variation of O antigens in gram-negative bacteria.

In: *Endotoxins: Structure, Function and Recognition*. Subcellular Biochemistry. 53. 123-152

ISBN 9789048190775.

WATERS, C. M. & BASSLER, B. L. (2005):

Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria.

Annual Review of Cell and Developmental Biology. 21, 319-346.

WATNICK, P. & KOLTER, R. (2000):

Biofilm, city of microbes.

Journal of Bacteriology. 182, 2675-2679.

WEBER, C., STEPHAN, R., DRUGGAN, P., JOOSTEN, H. & IVERSEN, C. (2009):

Improving the enrichment procedure for *Enterobacteriaceae* detection.

Food Microbiology. 26, 565-572.

WEIS, J. & SEELIGER, H. P. (1975):

Incidence of *Listeria monocytogenes* in nature.

Applied Microbiology. 30, 29-32.

WHITEHEAD, N. A., BARNARD, A. M., SLATER, H., SIMPSON, N. J. & SALMOND, G. P. (2001):

Quorum-sensing in Gram-negative bacteria.

FEMS Microbiology Reviews. 25, 365-404.

WHITFIELD, C. (1995):

Biosynthesis of lipopolysaccharide O antigens.

Trends in Microbiology. 3, 178-185.

WHITFIELD, C. (2006):

Biosynthesis and assembly of capsular polysaccharides in *Escherichia coli*.

Annual Review of Biochemistry. 75, 39-68.

WILLIS, L. M. & WHITFIELD, C. (2013):

Structure, biosynthesis, and function of bacterial capsular polysaccharides synthesized by ABC transporter-dependent pathways.

Carbohydrate Research. 378, 35-44.

XU, H. S., ROBERTS, N., SINGLETON, F. L., ATTWELL, R. W., GRIMES, D. J. & COLWELL, R. R. (1982):

Survival and viability of nonculturable *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* in the estuarine and marine environment.

Microbial Ecology. 8, 313-323.

YAN, Q. & FANNING, S. (2015):

Strategies for the identification and tracking of *Cronobacter* species: an opportunistic pathogen of concern to neonatal health.

Frontiers in Pediatrics. 3, 38.

ZHU, K., DIDIER, A., DIETRICH, R., HEILKENBRINKER, U., WALTENBERGER, E., JESSBERGER, N., MARTLBAUER, E. & BENZ, R. (2016):

Formation of small transmembrane pores: An intermediate stage on the way to *Bacillus cereus* non-hemolytic enterotoxin (Nhe) full pores in the absence of NheA.

Biochemical and Biophysical Research Communications. 469, 613-618.

ZHU, S., SCHNELL, S. & FISCHER, M. (2013):

Growth inhibition of *Cronobacter* spp. strains in reconstituted powdered infant formula acidified with organic acids supported by natural stomach acidity.

Food Microbiology. 35, 121-128.

ZOGAJ, X., BOKRANZ, W., NIMTZ, M. & ROMLING, U. (2003):

Production of cellulose and curli fimbriae by members of the family *Enterobacteriaceae* isolated from the human gastrointestinal tract.

Infection and Immunity. 71, 4151-4158.

ZOGAJ, X., NIMTZ, M., ROHDE, M., BOKRANZ, W. & ROMLING, U. (2001):

The multicellular morphotypes of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* produce cellulose as the second component of the extracellular matrix.

Molecular Microbiology. 39, 1452-1463.

IX. ANHANG

Tabelle 9: Induktionsverlauf des VBNC-Stadiums von *C. sakazakii*-Stämmen durch Austrocknung.

		Mittelwert der Bakterientiter [CFU/Well] Standardabweichung [CFU/Well]						
<i>C. sakazakii</i> -Stamm:		0 d	7 d	14 d	21 d	28 d	42 d	63 d
Aggregatzellen	ES 5	1,92E+08 ±1,73E+07	1,80E+04 ±2,09E+04	6,65E+03 ±2,47E+02	–	–	–	–
	ES 5 Δwzx	1,36E+08 ±1,41E+07	2,34E+03 ±1,80E+02	7,95E+02 ±4,60E+02	8,35E+01 ±2,37E+01	6,65E+01 ±4,70E+01	–	–
	21122	8,76E+07 ±4,24E+05	7,95E+03 ±4,60E+02	1,95E+03 ±2,09E+02	1,05E+02 ±3,08E+01	–	–	–
	21029	3,32E+07 ±1,81E+07	1,40E+04 ±9,19E+02	7,35E+03 ±1,06E+02	1,05E+03 ±2,65E+02	7,50E+01 ±3,54E+01	–	–
	21029 Δwzx	1,74E+08 ±5,66E+06	4,75E+04 ±3,29E+03	1,06E+04 ±4,07E+03	1,76E+03 ±2,47E+02	8,90E+01 ±6,29E+01	–	–
Planktonische Zellen	ES 5	2,22E+08 ±1,98E+07	6,85E+06 ±2,12E+05	2,20E+06 ±1,94E+05	8,10E+02 ±8,84E+01	8,55E+02 ±7,88E+02	4,66E+02 ±1,66E+01	–
	ES 5 Δwzx	4,48E+08 ±1,71E+08	1,00E+05 ±1,13E+04	2,63E+03 ±3,18E+02	8,35E+01 ±1,18E+02	5,45E+01 ±6,46E+01	1,99E+02 ±1,41E+02	–
	21122	2,44E+07 ±1,98E+06	5,25E+04 ±6,00E+04	2,58E+04 ±3,07E+04	1,94E+03 ±2,72E+02	4,34E+02 ±5,67E+02	5,48E+02 ±3,55E+02	–
	21029	4,34E+09 ±1,56E+08	4,11E+05 ±4,53E+04	2,37E+04 ±2,64E+04	2,97E+03 ±1,34E+02	9,75E+02 ±1,12E+03	1,27E+03 ±4,60E+02	–
	21029 Δwzx	1,93E+08 ±4,10E+07	5,50E+04 ±7,95E+03	2,10E+04 ±2,34E+04	1,36E+04 ±1,74E+04	2,12E+02 ±1,50E+02	3,48E+03 ±0,00E+00	–

– : Kein Wachstum

Tabelle 10: Reaktivierung von *C. sakazakii*-Stämmen in Säuglingsanfangsmilch.

		Bakterientiter [CFU/ml]							
Replik 1		0 h	2 h	4 h	6 h	8 h	10 h	12 h	14 h
Aggregatzellen	ES 5	–	–	–	–	–	–	–	6,67E+01
	ES 5 Δwzx	–	–	–	–	–	–	–	–
	21122	–	–	–	1,00E+02	1,06E+03	6,06E+03	3,13E+04	1,15E+06
	21029	–	–	2,00E+02	2,00E+02	$\geq 2,00E+02$	$\leq 1,27E+03$	1,27E+03	1,10E+05
	21029 Δwzx	–	–	–	–	–	2,00E+02	1,27E+03	8,09E+04
Planktonische Zellen	ES 5	–	–	–	–	6,33E+02	2,33E+03	2,09E+04	5,98E+05
	ES 5 Δwzx	–	–	–	–	2,67E+02	6,97E+02	1,02E+04	1,20E+05
	21122	–	–	–	–	8,79E+02	4,42E+03	2,18E+04	4,64E+05
	21029	–	–	1,00E+02	1,67E+02	8,49E+02	2,70E+03	2,36E+04	1,95E+05
	21029 Δwzx	–	–	–	–	6,67E+01	6,67E+01	2,67E+02	1,45E+04
Replik 2		0 h	3 h	5 h	7 h	9 h	11 h	13 h	
Aggregatzellen	ES 5	–	–	–	–	–	–	–	
	ES 5 Δwzx	–	–	–	–	–	–	–	
	21122	–	1,33E+02	1,21E+02	1,33E+02	7,30E+02	1,80E+04	2,17E+04	
	21029	–	–	–	–	–	–	–	
	21029 Δwzx	–	–	–	–	–	–	–	
Planktonische Zellen	ES 5	–	–	–	–	–	–	–	
	ES 5 Δwzx	–	–	–	–	–	–	–	
	21122	–	1,33E+02	1,67E+02	1,67E+02	6,03E+02	7,39E+04	1,28E+06	
	21029	–	6,67E+01	1,50E+02	1,67E+02	2,00E+02	4,44E+03	2,05E+05	
	21029 Δwzx	–	–	–	–	–	–	–	

Tabelle 11: Reaktivierung von *C. sakazakii*-Stämmen in Caco-2-Kulturüberstand.

Bakterientiter [CFU/ml]																
Replikat 1		12 h	13 h	14 h	15 h	16 h	17 h	18 h	19 h	20 h	21 h	22 h	23 h	24 h	30 h	
Aggregatzellen	ES 5	-	2,67E+02	≥2,00E+02	≥2,00E+02	≥2,00E+02	≥2,00E+02	≥2,00E+02	≥2,00E+02	≥2,00E+02	≥2,00E+02	≤2,32E+08	2,32E+08	≥2,00E+08	1,15E+08	
	ES 5 Δwzx	-	2,00E+02	≥2,00E+02	≤3,80E+04	3,80E+04	≤4,00E+05	≤4,00E+05	≤4,00E+05	4,00E+05	≥4,00E+05	≥4,00E+05	≥4,00E+05	2,61E+05	4,44E+09	
	21122	-	1,33E+02	1,82E+02	3,33E+02	1,21E+03	5,88E+03	1,64E+04	8,49E+04	≥8,49E+04	3,58E+05	3,64E+06	1,22E+09	≥1,22E+09	5,65E+09	
	21029	≤3,47E+08	≤3,47E+08	≤3,47E+08	3,47E+08	3,80E+08	9,33E+08	≥9,00E+08	≤2,13E+09	2,13E+09	≥2,00E+09	2,17E+09	≥2,00E+09	≥2,00E+09	7,75E+09	
	21029 Δwzx	≤1,34E+06	1,34E+06	1,54E+06	3,33E+07	1,80E+08	2,33E+08	4,33E+08	4,67E+08	7,00E+08	≥7,00E+08	8,27E+08	1,46E+09	≤7,88E+08	7,88E+08	
Planktonische Zellen	ES 5	1,31E+04	3,73E+04	1,32E+05	2,50E+05	1,61E+06	5,33E+07	8,00E+07	≥8,00E+07	4,67E+08	≥4,67E+08	7,07E+08	≥7,07E+08	3,37E+08	1,40E+09	
	ES 5 Δwzx	≤1,80E+08	≤1,80E+08	≤1,80E+08	1,80E+08	2,67E+08	9,53E+08	≥9,00E+08	≥9,00E+08	≥9,00E+08	≤1,23E+09	1,23E+09	≥1,00E+09	≥1,00E+09	2,30E+09	
	21122	1,75E+04	3,75E+04	2,07E+05	3,62E+05	1,98E+06	2,00E+07	5,33E+07	1,34E+08	3,00E+08	1,71E+08	8,00E+08	2,28E+09	≤8,49E+09	8,49E+09	
	21029	≤4,13E+08	≤4,13E+08	≤4,13E+08	4,13E+08	4,53E+08	≤4,00E+08	≤4,00E+08	≤1,80E+09	1,80E+09	≥1,00E+09	2,13E+09	≥2,00E+09	≥2,00E+09	2,04E+09	
	21029 Δwzx	≤2,11E+06	2,11E+06	2,21E+06	4,67E+07	1,20E+08	2,87E+08	4,00E+08	1,13E+09	≥1,00E+09	≥1,00E+09	1,11E+09	≥1,00E+09	≥1,00E+09	1,13E+09	
Replikat 2		12 h	13 h	14 h	15 h	16 h	17 h	18 h	19 h	20 h	21 h	22 h	23 h	24 h	30 h	
Aggregatzellen	ES 5	≤4,67E+07	≤4,67E+07	≤4,67E+07	4,67E+07	≥4,67E+07	≥4,67E+07	≥4,67E+07	≥4,67E+07	≥4,67E+07	≥4,67E+07	≥4,67E+07	≥4,67E+07	≥4,67E+07	≤5,67E+09	5,67E+09
	ES 5 Δwzx	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	21122	≤3,30E+06	3,30E+06	≥3,30E+06	≤2,80E+08	2,80E+08	≥2,00E+08	2,73E+08	3,33E+08	4,80E+08	≥4,80E+08	≥4,80E+08	≥4,80E+08	≥4,80E+08	≥4,80E+08	
	21029	≤9,93E+08	≤9,93E+08	≤9,93E+08	≤9,93E+08	9,93E+08	≥9,00E+08	≤1,27E+09	1,27E+09	≥1,00E+09	≤2,24E+09	2,24E+09	≥1,00E+09	1,21E+09	6,91E+09	
	21029 Δwzx	≤2,71E+06	2,71E+06	1,87E+07	3,27E+08	4,93E+08	5,00E+08	5,53E+08	1,13E+09	≥1,00E+09	≤1,02E+09	1,02E+09	≥1,00E+09	1,18E+09	≥1,00E+09	
Planktonische Zellen	ES 5	≤3,67E+06	3,67E+06	≥3,00E+06	7,40E+08	≥7,00E+08	9,47E+08	≥9,00E+08	1,13E+09	1,01E+09	≥1,00E+09	1,37E+09	3,29E+09	1,67E+09	≥1,00E+09	
	ES 5 Δwzx	≤4,23E+06	4,23E+06	≥4,00E+06	3,20E+08	3,53E+08	6,00E+08	≥5,00E+08	6,00E+08	7,60E+08	≥7,00E+08	1,74E+09	1,13E+09	1,39E+09	≥1,00E+09	
	21122	6,67E+02	2,67E+03	8,36E+03	1,90E+04	3,17E+04	2,68E+05	1,30E+06	8,80E+07	≥5,00E+07	5,00E+07	1,28E+08	1,30E+09	≥1,00E+09	≥1,00E+09	
	21029	≤2,00E+08	≤2,00E+08	≤2,40E+08	2,40E+08	6,20E+08	1,59E+09	≥1,00E+09	≤1,97E+09	1,97E+09	≤2,35E+09	2,35E+09	1,07E+09	1,13E+09	≥1,00E+09	
	21029 Δwzx	≤2,68E+06	2,68E+06	1,83E+07	2,33E+08	2,67E+08	5,33E+08	≤1,00E+09	1,00E+09	≤1,19E+09	≤1,19E+09	≤1,19E+09	≤1,19E+09	1,19E+09	≥1,19E+09	

Tabelle 12: Reaktivierung von *C. sakazakii*-Stämmen unter *in vitro* gastrointestinalen Bedingungen.

		Mittelwert der Bakterientiter [CFU/ml] Standardabweichung [CFU/ml]			
<i>C. sakazakii</i> -Stamm:		18 h	20 h	22 h	24 h
Planktonische Zellen	ES 5	5,60E+07 ±8,25E+07	3,93E+08 ±1,07E+08	1,39E+09 ±2,12E+08	8,01E+09 ±3,40E+08
	21222	8,57E+08 ±8,01E+07	2,03E+09 ±3,48E+08	1,85E+09 ±4,25E+06	2,37E+09 ±4,25E+07
	21029	2,00E+02 ±4,71E+01	2,22E+03 ±1,65E+02	7,75E+04 ±2,55E+03	4,49E+06 ±2,57E+05

Tabelle 13: Invasionsverhalten von *C. sakazakii*-Stämmen in Caco-2-Zellen.

		Mittelwert der Bakterientiter [CFU/ml] Standardabweichung [CFU/ml]			
		Caco-2-Zellen (1d)		ausdifferenzierte Caco-2-Zellen (16 d)	
<i>C. sakazakii</i> -Stamm:		0 h	2,5 h	0 h	2,5 h
ES 5		6,73E+06	9,74E+04 ±7,07E+03	1,46E+07 ±0,00E+00	1,04E+06 ±1,41E+04
ES 5 Δ wzx		1,09E+07	1,12E+05 ±1,23E+04	1,08E+07 ±8,64E+05	6,24E+05 ±1,89E+04
21122		3,98E+06	2,19E+03 ±1,65E+03	3,51E+06 ±5,68E+04	6,07E+04 ±1,84E+03
21029		5,42E+06	1,67E+02 ±1,41E+02	4,89E+05 ±1,35E+03	1,79E+03 ±2,92E+02
21029 Δ wzx		4,85E+06	1,33E+02 ±9,43E+01	5,56E+06 ±9,91E+04	1,42E+04 ±1,76E+04

Tabelle 14: Invasionsverhalten von Aggregaten und planktonischen Zellen von *C. sakazakii*-Stämmen in Caco-2-Zellen.

		Mittelwert der Bakterientiter [CFU/ml] Standardabweichung [CFU/ml]			
		Caco-2-Zellen (1d)		ausdifferenziert Caco-2-Zellen (16 d)	
		0 h	2,5 h	0 h	2,5 h
<i>C. sakazakii</i> -Stamm:					
Aggregatzellen	ES 5	5,57E+04 ±8,33E+02	1,78E+02 ±3,14E+01	7,52E+04 ±1,41E+02	5,05E+02 ±1,07E+02
	ES 5 Δwzx	2,40E+04 ±5,63E+03	6,67E+01 ±4,71E+01	1,14E+05 ±1,41E+03	1,05E+03 ±2,12E+01
	21122	2,52E+06 ±1,13E+05	6,98E+02 ±2,14E+00	3,70E+07 ±0,00E+00	2,42E+04 ±2,55E+04
	21029	7,43E+06 ±9,84E+05	3,91E+03 ±3,43E+02	1,00E+07 ±1,24E+07	2,83E+04 ±1,80E+04
	21029 Δwzx	1,69E+06 ±1,10E+05	1,48E+03 ±1,71E+02	7,64E+07 ±4,31E+06	1,33E+02 ±0,00E+00
Planktonische Zellen	ES 5	4,69E+04 ±4,42E+03	2,17E+02 ±2,36E+01	5,69E+04 ±2,19E+03	4,73E+02 ±6,22E+01
	ES 5 Δwzx	9,06E+05 ±7,29E+04	3,10E+03 ±5,00E+01	1,62E+05 ±6,36E+03	3,00E+02 ±4,67E+01
	21122	1,87E+06 ±1,49E+05	9,55E+02 ±2,14E+01	1,10E+07 ±4,24E+05	1,65E+03 ±1,41E+02
	21029	1,70E+06 ±3,19E+04	2,14E+03 ±2,14E+01	2,59E+07 ±3,57E+07	1,80E+04 ±1,63E+03
	21029 Δwzx	1,64E+06 ±6,37E+03	3,17E+02 ±2,36E+01	8,35E+07 ±4,10E+06	1,00E+02 ±4,69E+01

Tabelle 15: Reaktivierung in Caco-2-Kulturüberstand und Invasion der VBNC-Zellen von *C. sakazakii*-Stämmen in Caco-2-Zellen.

		Mittelwert der Bakterientiter [CFU/ml] Standardabweichung [CFU/ml]						
		Caco-2-Kulturüberstand			Caco-2-Zelllysate			
		0 h	24 h	48 h	0 h	9 h	24 h	48 h
C. sakazakii-Stamm:		0 h	24 h	48 h	0 h	9 h	24 h	48 h
Aggregatzellen	ES 5	5,13E+06	1,62E+10	1,72E+10	1,11E+04 ±5,95E+02	7,72E+04 ±6,37E+03	5,07E+04 ±5,16E+03	4,42E+04 ±3,20E+03
	ES 5 Δwzx	–	–	–	–	–	–	–
	21122	1,56E+08	1,60E+08	1,69E+08	–	–	–	–
	21029	–	–	–	–	–	–	–
	21029 Δwzx	–	–	–	–	–	–	–
Planktonische Zellen	ES 5	1,53E+09	1,91E+10	9,33E+08	1,43E+05 ±5,52E+03	9,06E+04 ±6,43E+03	4,33E+04 ±4,29E+02	5,36E+04 ±2,81E+03
	ES 5 Δwzx	1,94E+08	9,00E+09	5,33E+08	1,31E+05 ±9,59E+03	4,37E+04 ±3,49E+03	3,30E+04 ±1,71E+03	1,14E+05 ±3,64E+02
	21122	1,47E+08	1,50E+08	8,16E+07	8,77E+03 ±4,25E+01	6,94E+03 ±2,97E+02	1,00E+02 ±4,71E+01	1,00E+01 ±0,00E+00
	21029	1,64E+06	1,12E+09	2,73E+09	1,00E+01 ±0,00E+00	3,00E+02 ±1,41E+02	1,09E+06 ±1,27E+04	6,33E+02 ±2,36E+02
	21029 Δwzx	6,73E+08	1,15E+09	3,87E+09	1,50E+02 ±7,07E+01	1,00E+02 ±4,71E+01	9,31E+05 ±2,97E+04	1,30E+03 ±8,57E+01

Tabelle 16: Ko-Infektion von *C. sakazakii* ES 5 mit *B. cereus* bzw. *L. monocytogenes* in ausdifferenzierte Caco-2-Zellen.

	Mittelwert der Bakterientiter [CFU/ml] Standardabweichung [CFU/ml]						
	0 h	0,5 h	2,5 h	7 h	24 h	48 h	72 h
Ko-Infektion mit <i>B. cereus</i>							
<i>C. sakazakii</i> ES 5 ^{Amp}	3,42E+07 ±4,29E+05	3,57E+04 ±2,23E+03	6,20E+06 ±5,33E+03	6,86E+05 ±6,73E+03	1,49E+05 ±1,47E+04	1,24E+06 ±6,37E+04	1,71E+06 ±2,53E+05
<i>C. sakazakii</i> ES 5 ^{Amp} -Kontrolle	3,42E+07 ±4,29E+05	6,21E+05 ±1,11E+05	5,65E+03 ±1,85E+02	1,48E+04 ±1,06E+02	1,48E+05 ±1,17E+04	1,76E+05 ±1,91E+03	1,83E+05 ±5,52E+03
Ko-Infektion mit <i>L. monocytogenes</i>							
<i>C. sakazakii</i> ES 5	2,31E+07 ±2,05E+06	5,29E+06 ±1,93E+05	1,41E+06 ±6,37E+03	1,31E+06 ±1,07E+04	1,02E+06 ±2,01E+04	8,20E+05 ±4,50E+04	7,79E+05 ±3,86E+04
<i>C. sakazakii</i> ES 5-Kontrolle	2,31E+07 ±2,05E+06	4,86E+06 ±3,21E+05	2,86E+04 ±2,79E+03	5,45E+05 ±2,57E+04	4,82E+04 ±1,07E+04	2,44E+05 ±1,91E+04	1,30E+06 ±2,36E+04

Tabelle 17: Ko-Infektion von *C. sakazakii* ES 5 mit *B. cereus* bzw. *L. monocytogenes* in HT-29-Zellen.

	Mittelwert der Bakterientiter [CFU/ml] Standardabweichung [CFU/ml]						
	0 h	0,5 h	2,5 h	7 h	24 h	48 h	72 h
Ko-Infektion mit <i>B. cereus</i>							
<i>C. sakazakii</i> ES 5 ^{Amp}	5,90E+07 ±5,31E+06	7,05E+06 ±2,14E+04	7,12E+03 ±1,50E+03	3,41E+04 ±2,79E+03	2,55E+04 ±8,57E+02	5,76E+02 ±4,29E+02	4,00E+02 ±0,00E+00
<i>C. sakazakii</i> ES 5 ^{Amp} -Kontrolle	5,90E+07 ±5,31E+06	5,65E+06 ±3,82E+05	4,32E+03 ±1,17E+03	3,58E+03 ±1,23E+02	1,21E+04 ±7,86E+02	8,33E+02 ±1,50E+02	2,45E+03 ±4,29E+01
Ko-Infektion mit <i>L. monocytogenes</i>							
<i>C. sakazakii</i> ES 5	4,87E+07 ±4,67E+06	5,86E+06 ±2,55E+05	7,27E+03 ±2,14E+03	1,00E+04 ±4,71E+03	3,49E+02 ±4,49E+01	1,00E+02 ±4,71E+01	–
<i>C. sakazakii</i> ES 5-Kontrolle	4,87E+07 ±4,67E+06	5,64E+06 ±3,86E+05	4,29E+03 ±1,12E+03	3,58E+03 ±1,23E+02	3,49E+02 ±4,49E+01	8,03E+02 ±1,07E+02	1,03E+03 ±1,21E+02

Tabelle 18: Ko-Infektion von *C. sakazakii* ES 5 mit *B. cereus* und *L. monocytogenes* in Caco-2- bzw. HT-29-Zellen.

	Mittelwert der Bakterientiter [CFU/ml] Standardabweichung [CFU/ml]			
	Ausdifferenzierte Caco-2-Zellen (16 d)		HT-29-Zellen (3 d)	
	0 h	2,5 h	0 h	2,5 h
<i>C. sakazakii</i> ES 5	9,57E+07 ±2,12E+05	1,69E+06 ±9,56E+04	4,55E+07 ±1,06E+06	–
<i>C. sakazakii</i> ES 5-Kontrolle	9,57E+07 ±2,12E+05	2,02E+05 ±5,31E+03	4,55E+07 ±1,06E+06	3,67E+03 ±1,41E+03
<i>L. m.</i> EGD-pIMK2- <i>gfp</i>	1,52E+07 ±9,46E+04	1,49E+05 ±6,37E+02	5,30E+07 ±4,88E+06	5,71E+05 ±4,07E+04
<i>L. m.</i> EGD-pIMK2- <i>gfp</i> -Kontrolle	1,52E+07 ±9,46E+04	2,38E+04 ±6,43E+02	5,30E+07 ±4,88E+06	7,99E+04 ±1,93E+03

Tabelle 19: Kolonisationsverhalten von *C. sakazakii* ES 5 nach Vorbehandlung der eukaryotischen Zellen mit Probiotika.

	Mittelwert der Bakterientiter [CFU/ml] Standardabweichung [CFU/ml]					
	ausdifferenzierte Caco-2-Zellen (16 d)			HT-29-Zellen (3 d)		
	0 h	0,5 h	2,5 h	0 h	0,5 h	2,5 h
<i>C. sakazakii</i> ES 5 + <i>L. casei</i>	3,64E+07 ±2,57E+06	1,52E+06 ±3,19E+04	7,26E+02 ±1,31E+02	7,27E+07 ±1,70E+06	5,65E+06 ±2,14E+04	1,19E+03 ±1,07E+02
<i>C. sakazakii</i> ES 5 + <i>L. rhamnosus</i>	3,64E+07 ±2,57E+06	1,46E+06 ±1,82E+04	1,27E+04 ±1,72E+03	7,27E+07 ±1,70E+06	5,70E+06 ±1,71E+05	4,00E+02 ±1,62E+02
<i>C. sakazakii</i> ES 5 + <i>L. helveticus</i>	3,64E+07 ±2,57E+06	1,32E+06 ±1,25E+05	1,15E+04 ±1,06E+03	7,27E+07 ±1,70E+06	5,29E+06 ±4,07E+05	4,44E+02 ±4,49E+01
<i>C. sakazakii</i> ES 5	3,64E+07 ±2,57E+06	5,72E+05 ±2,13E+03	1,24E+05 ±2,14E+02	7,27E+07 ±1,70E+06	3,55E+06 ±4,29E+04	5,88E+03 ±5,02E+00

Tabelle 20: Kolonisationsverhalten von *C. sakazakii* ES 5 bei Ko-Infektion mit Probiotika.

	Mittelwert der Bakterientiter [CFU/ml] Standardabweichung [CFU/ml]		
	HT-29-Zellen (3 d)		
	0 h	0,5 h	2,5 h
<i>C. sakazakii</i> ES 5 + <i>L. casei</i>	4,49E+08 ±4,29E+06	1,02E+06 ±8,96E+04	–
<i>C. sakazakii</i> ES 5 + <i>L. rhamnosus</i>	4,49E+08 ±4,29E+06	9,18E+05 ±4,95E+04	–
<i>C. sakazakii</i> ES 5 + <i>L. helveticus</i>	4,49E+08 ±4,29E+06	1,77E+06 ±5,66E+04	5,00E+01 ±2,36E+01
<i>C. sakazakii</i> ES 5	4,49E+08 ±4,29E+06	4,62E+06 ±2,79E+05	2,80E+03 ±4,50E+02

In der Caco-2-Zelllinie konnten keine *C. sakazakii*-Zellen zu den o.g. Zeitpunkten reisoliert werden.

Tabelle 21: Kolonisationsverhalten von *C. sakazakii* ES 5 nach Vorbehandlung der eukaryotischen Zellen mit dem Überstand probiotischer Mikroorganismen.

		Mittelwert der Bakterientiter [CFU/ml] Standardabweichung [CFU/ml]					
		ausdifferenzierte Caco-2-Zellen (16 d)			HT-29-Zellen (3 d)		
		0 h	0,5 h	2,5 h	0 h	0,5 h	2,5 h
Überstand, pH = 3-4	ES 5 + <i>L. casei</i>	3,83E+07 ±4,88E+06	7,24E+05 ±9,34E+04	–	1,54E+08 ±1,35E+07	5,18E+06 ±8,57E+04	8,64E+02 ±6,43E+01
	ES 5 + <i>L. rhamnosus</i>	3,83E+07 ±4,88E+06	6,56E+05 ±1,07E+04	–	1,54E+08 ±1,35E+07	5,53E+06 ±1,14E+06	4,55E+02 ±2,57E+02
	ES 5 + <i>L. helveticus</i>	3,83E+07 ±4,88E+06	5,79E+05 ±2,16E+04	–	1,54E+08 ±1,35E+07	5,26E+06 ±5,79E+05	1,58E+03 ±2,14E+02
	ES 5	3,83E+07 ±4,88E+06	8,55E+05 ±5,76E+04	1,63E+05 ±3,43E+03	1,54E+08 ±1,35E+07	6,26E+06 ±1,07E+05	4,71E+03 ±3,21E+02
Überstand, pH = 7	ES 5 + <i>L. casei</i>	3,83E+07 ±4,88E+06	1,01E+06 ±1,30E+05	1,06E+05 ±6,43E+02	1,54E+08 ±1,35E+07	6,30E+06 ±3,00E+05	2,24E+03 ±8,57E+01
	ES 5 + <i>L. rhamnosus</i>	3,83E+07 ±4,88E+06	9,20E+05 ±4,03E+04	9,06E+04 ±1,71E+03	1,54E+08 ±1,35E+07	5,71E+06 ±3,21E+05	1,62E+03 ±1,50E+02
	ES 5 + <i>L. helveticus</i>	3,83E+07 ±4,88E+06	7,73E+05 ±4,29E+03	8,61E+04 ±3,86E+03	1,54E+08 ±1,35E+07	7,05E+06 ±5,36E+05	2,92E+03 ±1,93E+02
	ES 5	3,83E+07 ±4,88E+06	8,55E+05 ±5,76E+04	1,63E+05 ±3,43E+03	1,54E+08 ±1,35E+07	6,26E+06 ±1,07E+05	4,71E+03 ±3,21E+02
Überstand hitzebehandelt, pH = 3-4	ES 5 + <i>L. casei</i>	3,83E+07 ±4,88E+06	8,63E+05 ±1,71E+04	–	1,54E+08 ±1,35E+07	3,70E+06 ±2,57E+05	1,68E+03 ±1,50E+02
	ES 5 + <i>L. hamnosus</i>	3,83E+07 ±4,88E+06	6,02E+05 ±1,91E+04	8,33E+01 ±2,36E+01	1,54E+08 ±1,35E+07	4,14E+06 ±1,50E+05	8,49E+02 ±8,57E+01
	ES 5 + <i>L. helveticus</i>	3,83E+07 ±4,88E+06	5,70E+05 ±9,15E+03	–	1,54E+08 ±1,35E+07	4,39E+06 ±1,29E+05	6,82E+02 ±2,14E+01
	ES 5	3,83E+07 ±4,88E+06	8,55E+05 ±5,76E+04	1,63E+05 ±3,43E+03	1,54E+08 ±1,35E+07	6,26E+06 ±1,07E+05	4,71E+03 ±3,21E+02

Tabelle 22: Wachstumsverhalten von *C. sakazakii* ES 5 und *B. cereus* bei Ko-Kultivierung in RPMI-Medium.

	Mittelwert der Bakterientiter [CFU/ml] Standardabweichung [CFU/ml]					
	0 h	1 h	2 h	3 h	4 h	5 h
<i>C. sakazakii</i> ES 5 + <i>B. cereus</i> F837/76	1,71E+07 ±9,50E+05	2,23E+07 ±8,88E+06	1,09E+08 ±1,04E+07	1,51E+08 ±7,11E+06	1,19E+08 ±1,03E+08	8,13E+08 ±2,41E+08
<i>B. cereus</i> F837/76 + <i>C. sakazakii</i> ES 5	2,80E+06 ±3,96E+05	3,87E+06 ±7,64E+05	3,65E+06 ±2,56E+05	4,00E+06 ±9,43E+05	7,00E+06 ±1,89E+06	7,72E+07 ±1,99E+06
<i>C. sakazakii</i> ES 5	1,71E+07 ±9,50E+05	2,10E+07 ±3,40E+06	1,14E+08 ±2,17E+07	1,25E+08 ±3,53E+07	1,17E+08 ±6,38E+07	1,19E+08 ±4,96E+07
<i>B. cereus</i> F837/76	2,80E+06 ±3,96E+05	2,90E+06 ±8,89E+05	5,16E+06 ±1,02E+06	8,08E+06 ±2,94E+06	7,89E+06 ±8,37E+05	1,85E+07 ±3,91E+06

Tabelle 23: Wachstumsverhalten von *C. sakazakii* ES 5 und probiotischen *Lactobacillus*-Stämmen bei Ko-Kultivierung in RPMI-Medium.

	Mittelwert der Bakterientiter [CFU/ml]					
	Standardabweichung [CFU/ml]					
	0 h	0,5 h	1 h	1,5 h	2 h	2,5 h
<i>C. sakazakii</i> ES 5 + <i>L. casei</i>	1,25E+07 ±1,25E+07	4,03E+06 ±4,03E+06	2,74E+06 ±2,74E+06	9,90E+05 ±9,90E+05	2,08E+05 ±2,08E+05	1,35E+05 ±1,35E+05
<i>C. sakazakii</i> ES 5 + <i>L. rhamnosus</i>	1,12E+07 ±1,12E+07	5,67E+05 ±5,67E+05	5,25E+04 ±5,25E+04	2,17E+04 ±2,17E+04	6,67E+03 ±6,67E+03	2,17E+03 ±2,17E+03
<i>C. sakazakii</i> ES 5 + <i>L. helveticus</i>	9,32E+06 ±9,32E+06	6,53E+06 ±6,53E+06	5,03E+05 ±5,03E+05	8,03E+04 ±8,03E+04	2,47E+04 ±2,47E+04	1,11E+04 ±1,11E+04
<i>C. sakazakii</i> ES 5	1,10E+07 ±1,61E+06	1,05E+07 ±1,06E+06	1,07E+07 ±1,94E+06	1,24E+07 ±4,05E+06	3,54E+07 ±1,96E+07	4,11E+07 ±1,54E+07
<i>L. casei</i>	3,50E+07 ±4,50E+06	3,45E+07 ±2,57E+06	5,00E+07 ±1,29E+07	5,86E+07 ±1,93E+06	7,25E+07 ±2,61E+07	6,82E+07 ±3,86E+06
<i>L. rhamnosus</i>	8,82E+08 ±9,00E+07	8,14E+08 ±2,12E+08	8,36E+08 ±2,19E+08	1,04E+09 ±4,31E+08	1,35E+09 ±3,47E+08	8,74E+08 ±1,40E+08
<i>L. helveticus</i>	1,35E+08 ±1,22E+07	1,28E+08 ±5,14E+06	1,36E+08 ±1,09E+07	1,45E+08 ±7,71E+06	1,12E+08 ±6,43E+05	8,41E+07 ±7,07E+06

Tabelle 24: Wachstum von *C. sakazakii* ES 5 in PIF mit Zusatz von sterilem Überstand von *Lactobacillus*-Stämmen.

	Mittelwert der Bakterientiter [CFU/ml]				
	Standardabweichung [CFU/ml]				
	Anfangsmilch		Folgemilch		Brei
	Milupa Aptamil	Alete	Milupa Milumil	Babylove	Nestlé Beba
<i>C. sakazakii</i> ES 5 + <i>L. casei</i>	1,55E+09 ±3,00E+08	9,70E+08 ±8,57E+07	1,05E+09 ±2,79E+08	1,98E+09 ±5,36E+08	3,09E+09 ±2,87E+08
<i>C. sakazakii</i> ES 5	4,98E+09 ±2,24E+08	6,80E+09 ±2,34E+08	7,21E+09 ±3,40E+08	9,22E+09 ±5,52E+08	8,36E+09 ±1,04E+09
<i>C. sakazakii</i> ES 5 + <i>L. rhamnosus</i>	3,23E+09 ±4,07E+08	7,14E+08 ±6,73E+07	2,76E+09 ±8,57E+07	1,45E+09 ±3,00E+08	5,59E+09 ±4,25E+08
<i>C. sakazakii</i> ES 5	7,96E+09 ±4,67E+08	1,02E+10 ±5,10E+08	1,00E+10 ±8,28E+08	2,91E+10 ±5,14E+09	9,32E+09 ±2,34E+08
<i>C. sakazakii</i> ES 5 + <i>L. helveticus</i>	1,92E+09 ±7,03E+07	1,05E+09 ±6,43E+07	1,98E+09 ±2,36E+08	1,62E+09 ±2,36E+08	3,69E+09 ±4,78E+08
<i>C. sakazakii</i> ES 5	4,98E+09 ±2,24E+08	6,80E+09 ±2,34E+08	7,21E+09 ±3,40E+08	9,22E+09 ±5,52E+08	8,36E+09 ±1,04E+09

X. DANKSAGUNG

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Erwin Märtlbauer für die Bereitstellung dieses interessanten und vielseitigen Themas sowie die freundliche Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit bedanken.

Mein größter Dank gilt meiner Betreuerin Dr. Kristina Schauer für die intensive Einarbeitung zu Beginn meiner Labortätigkeit, für die hervorragende Betreuung während meiner gesamten Zeit am Lehrstuhl und die Mühe, die sie in die Korrektur dieser Arbeit investiert hat. Liebe Kristina, ich bedanke mich für deine sympathische Art, deinen Humor und unsere vielen lustigen Gespräche, welche die Arbeit im Labor aufgelockert haben. Deine Begeisterung für die wissenschaftliche Arbeit hat mich sehr beeindruckt und dazu inspiriert, fortwährend kreativ und neugierig zu sein. Deine unermüdliche Hilfsbereitschaft im Labor und deine zuverlässige Unterstützung bei der Anfertigung der Dissertation haben maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Weiterhin möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Lehrstuhls, insbesondere bei Gaby Acar und Nele Maxseiner für die tatkräftige Unterstützung im Labor sowie bei Angela Tischler für die Unterstützung bei allen administrativen Angelegenheiten und die humorvollen Anekdoten in den Mittagspausen bedanken. An die freundliche Zusammenarbeit, die schönen Feiern, Ausflüge und das Teamgefühl beim Fußballspielen werde ich mich immer gerne zurück erinnern.

Bei den „Milchmädchen“ Claudia, Eva und Franziska bedanke ich mich für die schöne Zeit während und nach der Arbeit am Lehrstuhl, für die gemütlichen Abende im Biergarten und beim Cocktailtrinken sowie unseren Ausflug zur Landshuter Hochzeit.

Meiner Familie bin ich unendlich dankbar dafür, dass sie mich dazu ermutigt haben, meine Träume zu verfolgen, meine Ziele zu erreichen und dass Sie mich bei jedem Schritt auf diesem Weg unterstützt haben. Ohne ihre uneingeschränkte Hilfe auf meinem gesamten Lebensweg, die motivierenden Worte, das Mitfiebern und Mitfreuen und das Wissen, dass Sie immer für mich da sind, hätte ich meine Ziele nicht erreichen können.

Von Herzen danke ich Roland für seinen unermesslichen Rückhalt, für sein großes Vertrauen in mich, seine Unterstützung in allen Lebenslagen und seinen Humor, der mich jeden Tag aufs Neue zum Lachen bringt.

Besonders möchte ich mich noch bei meinen Mädels für die unvergessliche und aufregende Zeit während des Studiums, die Ablenkung in den anstrengenden

Prüfungsphasen, die wunderbaren Urlaube und die tiefe Verbundenheit darüber hinaus bedanken.